

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293257 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

(22) Дата подачи заявки
2021.05.12

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01)
A61K 31/423 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ТЕРАПИИ TTR АМИЛОИДОЗА

(31) 20174177.4
(32) 2020.05.12
(33) EP
(86) PCT/EP2021/062706
(87) WO 2021/228987 2021.11.18
(71) Заявитель:
НЕЙРИМБЬОН АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Михалон Аубин, Гримм Ян (CH)
(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложено комбинированное терапевтическое средство/комбинированная терапия для применения в способе лечения транстиретинового амилоидоза (ATTR) у субъекта, при этом указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела к транстиретину (TTR) и терапевтически эффективного количества стабилизатора тетрамера TTR. Дополнительно, описаны фармацевтические комбинированные продукты и комплект, содержащие антитело к TTR и стабилизатор тетрамера TTR, а также режим лечения для их комбинированного применения в лечении ATTR.

A1

202293257

202293257

A1

КОМБИНИРОВАННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ТЕРАПИИ TTR АМИЛОИДОЗА

В настоящей заявке испрашивается приоритет на основании европейской патентной заявки EP 20174177.4, поданной 12 мая 2020 г., содержание которой полностью

5 включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к комбинированной терапии/комбинированному терапевтическому средству для применения в способе
10 лечения транстиретинового амилоидоза (ATTR) у субъекта, при этом указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела к транстиретину (TTR) и терапевтически эффективного количества стабилизатора тетрамера TTR.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15 Транстиретиновый амилоидоз (ATTR) представляет собой тяжелое ассоциированное с возрастом заболевание, приводящее к кардиомиопатии и/или сенсомоторной полинейропатии (Gertz *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol. 66 (2015), 2451-24661), и включает два подтипа: ATTR дикого типа (wtATTR) и вариантный ATTR (vATTR), которые имеют различный патогенез. Лежащий в основе патогенеза обоих типов белок транстиретин
20 (TTR) выполняет физиологические функции транспортного белка для тироксина и ретинол-связывающего белка. TTR преимущественно синтезируется в печени, и его естественной формой является тетрамер (Alshehri *et al.*, J. Neuroendocrinol. 27 (2015), 303–3239). vATTR, ранее известный как наследственный/мутантный ATTR, представляет собой аутосомно-доминантное нарушение. В случае как белков TTR
25 дикого типа (wtTTR), так и мутантных/вариантных белков TTR (vTTR), механизм патогенеза ATTR запускается частичным разворачиванием белка TTR и последующей агрегацией в β -складчатые листы, образующие амилоидные фибриллы (Eisele *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. 14 (2015), 759–780).

30 Для ATTR характерны две основные формы клинического проявления. Преобладающее накопление амилоидных фибрилл в тканях сердца приводит к кардиомиопатии, тогда как отложение фибрилл в нервных волокнах приводит к полинейропатии (Ando *et al.*,

Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. Orphanet J. Rare Dis. 2013;8:31). Факторы, запускающие отложение амилоида в определенном органе, еще не выяснены. У пациентов обычно присутствует комплекс симптомов, при этом известно только несколько мутаций TTR, которые вызывают исключительно заболевания сердца или нейропатические заболевания (Maurer *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol. 68 (2016), 161–172).

Лечение ATTR основано на трех признанных в настоящее время принципах:

- (i) vTTR почти полностью заменяется в периферической крови после ортотопической трансплантации печени благодаря синтезу wtTTR в донорской печени. Конечно же, трансплантация не является вариантом для лечения заболевания в обычных случаях.
- (ii) Низкомолекулярные соединения стабилизируют тетрамер TTR и тем самым сводят к минимуму образование предшественников амилоида. Дифлунизал, AG10 и тафамидис стабилизируют физиологический тетрамер TTR. Тафамидис был одобрен для лечения ATTR 1-й стадии с 2011 года.
- (iii) Факторы сайленсинга генов (мРНК-ингибирующие олигонуклеотиды) уменьшают количество vTTR и wtTTR, секретируемых печенью. Инотерсен представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, который вводят подкожно (п/к) один раз в неделю. Патисиран действует как олигонуклеотид мРНК, вводимый внутривенно (в/в) каждые три недели в комбинации с препаратами для премедикации. Оба фактора сайленсинга генов были одобрены в 2018 году для лечения ATTR 1-й и 2-й стадий.

Параллельно проводятся исследования моноклональных антител в качестве дополнительных агентов для потенциального лечения ATTR, включая моноклональные антитела к TTR и к сывороточному амилоидному Р-компоненту (анти-SAP).

Обзор различных стратегий лечения приведен в публикациях Müller *et al.*, European Journal of Heart Failure 22 (2020), 39-53 и Gertz *et al.*, Brain Behav. 9 (2019), e01371.

Хотя каждое из существующих лекарственных средств и принципов открывает большие перспективы для улучшения состояния пациентов с ATTR и ассоциированными с ним состояниями, все еще сохраняется потребность в терапевтических стратегиях, которые позволят решить клиническую проблему, заключающуюся в том, что ранние и поздние

стадии ATTR могут требовать различного лечения, и для определения оптимального лечения для каждого конкретного пациента необходимо дополнительное исследование.

Данная техническая проблема решается благодаря вариантам реализации, охарактеризованным в формуле изобретения и дополнительно описанным ниже, а также проиллюстрированным с помощью примеров и фигур.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на наблюдении, что комбинированное применение антитела к TTR со стабилизатором тетрамера TTR неожиданно демонстрирует синергетическое действие в отношении элиминации амилоидных фибрилл TTR *in vivo*. В частности, как проиллюстрировано в примерах, совместное лечение мышей с трансплантатами амилоидных фибрилл TTR, полученных от пациентов, с применением стабилизатора тетрамера TTR тафамидиса усиливает индукцию элиминации патологических амилоидных фибрилл TTR рекомбинантным моноклональным антителом человека к TTR, которое нацелено исключительно на ассоциированную с заболеванием конформацию амилоида TTR и имеет высокую аффинность связывания. Соответственно, настоящее изобретение относится в целом к комбинированному терапевтическому средству для применения в способе лечения ATTR у субъекта, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела к TTR и терапевтически эффективного количества стабилизатора тетрамера TTR. Согласно настоящему изобретению, антитело к TTR специфически распознает неправильно свернутый TTR, нацелено с высокой аффинностью на ассоциированную с заболеванием конформацию амилоида, но не на физиологические формы TTR, и способно облегчать элиминацию амилоида TTR, в то время как стабилизатор тетрамера TTR предотвращает диссоциацию тетрамеров TTR на амилоидогенные мономеры. Согласно настоящему изобретению антитело к TTR и стабилизатор тетрамера TTR могут быть представлены в фармацевтическом продукте, например, в отдельных компартментах, и предназначены для комбинированного применения, как описано в настоящем документе ниже и проиллюстрировано в прилагаемых примерах.

Недавно было предложено провести в будущем клинические исследования совместного лечения ATTR с применением лекарственных средств, созданных на основе различных принципов, упомянутых в разделе «Уровень техники»; см. ссылки на

публикации Müller *et al.* (2020) и Gertz *et al.* (2019) выше. Однако, как также отмечают авторы, хотя в принципе многие комбинации теоретически могут быть возможны, требуется тщательное их рассмотрение, например, из-за потенциальных лекарственных взаимодействий.

5

Действительно, эксперименты, проведенные в ходе разработки настоящего изобретения, показали, что связывание антитела к TTR, которое специфически распознает неправильно свернутый TTR и примером которого является антитело NI-301.37F1 к TTR, с амилоидом TTR сохраняется в присутствии стабилизаторов тетрамера TTR
10 дифлунизала, тафамидиса и AG10 (см. фиг. 1 и пример 1; фиг. 5A и пример 4), однако значение EC₅₀ увеличивалось в присутствии дифлунизала, в то время как в присутствии тафамидиса такого влияния на значение EC₅₀ антитела практически не наблюдалось. Еще более важно, что благодаря новой разработанной заявителем мышиной модели амилоидного ксенотрансплантата, полученного от пациента (patient-derived amyloid
15 xenograft, PDAX), раскрытой в WO 2020/094883 A1, оказалось возможным показать, что неожиданно в присутствии тафамидиса элиминация *in vivo* патологических фибрилл TTR, индуцированная антителом, по-видимому, даже усиливалась, в то время как при совместном лечении с дифлунизалом элиминация патологических фибрилл амилоидогенного TTR еще сохранялась на существенном уровне по сравнению с
20 контролем, но скорость элиминации, по-видимому, была ниже по сравнению с лечением только антителом, хотя и статистически незначимо, с учетом *p*-значения (см. фиг. 2 и пример 2).

Таким образом, принимая во внимание дополнительное стабилизирующее воздействие
25 на тетрамер TTR, эксперименты, выполненные в рамках настоящего изобретения, показывают, что стабилизаторы TTR, такие как тафамидис, дифлунизал и AG10, подходят для комбинированного средства для терапии или комбинированной терапии ATTR. Однако, как также показано в примерах, вероятны лекарственные взаимодействия между антителом к TTR и стабилизатором тетрамера TTR, которые могут различаться с
30 точки зрения возможного поддерживающего и синергетического воздействия на элиминацию патологических амилоидных фибрилл TTR, индуцированную антителом к TTR.

Без намерения ограничения какой-либо определенной теорией, полагают, что дифлунизал, благодаря его известным противовоспалительным свойствам, обладает иммуносупрессивной активностью, что может не способствовать индуцированной антителом к TTR элиминации фибрилл TTR иммунными клетками. Опять же, с помощью

5 разработанной заявителем мышинной модели PDAX, раскрытой в WO 2020/094883 A1, удалось подтвердить, что антитело к TTR опосредует элиминацию фибрилл ATTR через эффекторную функцию антитела, в частности, антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ); см. пример 3 и фиг. 3, которые демонстрируют, что для опосредованной антителом элиминации фибрилл фагоцитарными иммунными клетками *in vivo*

10 необходим активный домен Fc. Соответственно, за счет своей иммуносупрессивной активности дифлунизал может не усиливать фагоцитоз, стимулируемый антителом к TTR.

Соответственно, в одном из вариантов реализации комбинированное терапевтическое

15 средство ATTR по настоящему изобретению антитело к TTR имеет активный домен Fc и способно индуцировать АЗКФ, а стабилизатор по существу лишен противовоспалительных свойств, т. е. иммуносупрессивной активности, которая может не способствовать фагоцитозу, стимулируемому антителом к TTR. Обе активности могут быть протестированы с применением мышинной модели PDAX, раскрытой в WO

20 2020/094883 A1 и проиллюстрированной в примерах.

В этом контексте специалисту в данной области техники известно, что эффекторная функция и ее выраженность, в частности, зависят от класса или изотипа IgG, и что IgG2 и IgG4 имеют только ослабленные эффекторные функции по сравнению с IgG1 или IgG3.

25 Следовательно, в предпочтительном варианте реализации антитело к TTR, применяемое в комбинированном терапевтическом средстве по настоящему изобретению, относится к классу или изотипу IgG1 или IgG3, наиболее предпочтительно IgG1. Конечно, помимо применения нативных IgG, могут быть генетически сконструированы иммуноглобулины, имеющие соответствующие эффекторные функции; см., например,

30 публикацию Saunders KO (2019) Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life. Front. Immunol. 10:1296. doi: 10.3389/fimmu.2019.01296.

Стабилизаторы тетрамеров TTR представляют собой малые молекулы, которые влияют на скорость-лимитирующий этап образования амилоидных фибрилл — диссоциацию тетрамеров TTR на амилоидогенные мономеры. В 1996 году впервые было показано, что связывание лиганда с любым из сайтов связывания тироксина или ретинол-связывающего белка на TTR стабилизирует его тетрамерную структуру и надежно предотвращает диссоциацию TTR. Тафамидис представляет собой малую молекулу, которая принадлежит к группе бензоксазолкарбоновых кислот, которые достигают высокой биодоступности при пероральном приеме, но не обладают активностью нестероидных противовоспалительных препаратов. Посредством связывания с тироксинсвязывающим сайтом на TTR с высокой аффинностью и селективностью тафамидис индуцирует дозозависимую кинетическую стабилизацию wtTTR и ряда вариантов vTTR, например, V30M, V122I и т. д. Дифлунизал — это нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП), обладающий иммуносупрессивной активностью и, дополнительно, свойствами стабилизации тетрамера TTR.

Как уже упоминалось, иммуносупрессивная активность дифлунизала может не поддерживать индуцированную антителом к TTR элиминацию фибрилл TTR иммунными клетками или не способствовать ей. Поскольку тафамидис не обладает упомянутой иммуносупрессивной активностью, он может быть способен поддерживать или усиливать опосредованную антителом к TTR элиминацию амилоида TTR и, следовательно, является предпочтительным для применения в комбинированном терапевтическом средстве/способе терапии с антителом к TTR. AG10, еще один стабилизатор тетрамера TTR, лишенный противовоспалительных свойств, подобно тафамидису, также, как ожидается, будет подходить для комбинированного терапевтического средства с антителом к TTR, специфичным к неправильно свернутому TTR, и, как и тафамидис, будет поддерживать или усиливать способность антитела обеспечивать элиминацию амилоидных фибрилл TTR.

Результаты, полученные в экспериментах, проиллюстрированных в примерах, имеют большое значение и представляют особый интерес, поскольку благодаря настоящему изобретению могут быть предложены более эффективные принципы для лечения ATTR. Так, например, известные в настоящее время подходы к лечению ATTR, в частности, применение стабилизаторов тетрамера TTR и антисмысловых/siPHK-олигонуклеотидов, только стабилизируют структурное и функциональное прогрессирование заболевания, и

обычно они эффективны только у пациентов с ранними стадиями заболевания, но не у пациентов с заболеванием на поздних стадиях или с поздним началом.

Напротив, комбинированная терапия/комбинированное терапевтическое средство по настоящему изобретению может дать начало новому и дополнительному способу лечения благодаря тому, что тетрамеры TTR стабилизируются и остаются в организме человека в количествах, достаточных для выполнения их физиологической функции, и что одновременно с этим из организма пациента элиминируется патологический амилоид TTR и предотвращается его образование в дальнейшем.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения будут очевидны из следующих далее описания и примеров.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Связывание антитела NI-301.37F1 с амилоидогенным TTR в присутствии стабилизаторов тетрамера TTR. Аффинность связывания оценивали с помощью ИФА в присутствии тафамидиса или дифлунизала в концентрации 10 мкг/мл.

Фигура 2. Оценка комбинированного терапевтического средства, направленного на элиминацию фибрилл TTR *in vivo*. А) Примеры иллюстраций. В) Количественное определение остаточного количества фибрилл TTR, выраженного в виде процента от площади трансплантата, через 96 часов после начала лечения. N = 6–8 мышей на группу, с 4 не последовательными срезами на мышь. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Фигура 3. Для антитело-опосредованной активности по элиминации фибрилл *in vivo* необходим активный домен Fc. Мышам с трансплантатами фибрилл ATTR однократно вводили ch.NI-301.37F1, ch.NI-301.37F1-LALAPG или иммуноглобулин того же изотипа в качестве контроля в дозе 5 мг/кг в/в и брали биоптаты кожи через 5 дней для проведения гистологического анализа. А) Примеры иллюстраций. В) Количественное определение остаточного количества фибрилл TTR через 5 дней после трансплантации фибрилл и введения препаратов для лечения: фибриллы ATTR покрывали

46 % площади трансплантата у мышей, получивших иммуноглобулин того же изотипа, 23,6 % у мышей, получивших ch.NI-301.37F1, и 46,5 % у мышей, получивших ch.NI-301.37F1-LALAPG. Напротив, у мышей, получивших ch.NI-301.37F1-LALAPG, не наблюдалась активность по элиминации фибрилл по сравнению с мышами, получившими антитело того же изотипа.

Фигура 4. Изучение селективности связывания NI-301.37F1 в присутствии тафамидиса и дифлунизала с применением биослойной интерферометрии (BLI). Примеры иллюстраций, демонстрирующих связывание NI-301.37F1 с А) растворимыми олигомерами ATTR (mis.WT-TTR) и отсутствие связывания NI-301.37F1 с В) тетрамерами TTR (tetr.WT-TTR).

Фигура 5. Изучение селективности связывания NI-301.37F1 в присутствии тафамидиса и AG10 с применением биослойной интерферометрии (BLI). Примеры иллюстраций, демонстрирующих связывание NI-301.37F1 с А) растворимыми олигомерами ATTR (mis.WT-TTR) и отсутствие связывания NI-301.37F1 с В) тетрамерами TTR (tetr.WT-TTR).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в целом относится к комбинированному терапевтическому средству/комбинированной терапии для применения в способе лечения транстиретинового амилоидоза (ATTR) у субъекта, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела к TTR и терапевтически эффективного количества стабилизатора тетрамера TTR. В частности, настоящее изобретение относится к вариантам реализации, описанным в формуле изобретения, раскрытым в описании и проиллюстрированным в примерах и на фигурах ниже.

Если не указано иное, в настоящем документе каждый термин имеет определение, предусмотренное в «Оксфордском словаре по биохимии и молекулярной биологии»: Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, переработан в 2000 г. и повторно издан в 2003 г., ISBN 0 19 850673 2; второе издание, опубликованное в 2006 г., ISBN 0-19-852917-1 978-0-19852917-0.

При использовании термина «ATTR», как правило, подразумевается vATTR, а также wtATTR, если не указано иное. Аналогично, если не указано иное, «TTR» также относится к wtTTR и vTTR. Термин «антитело к TTR» обычно относится к антителу, которое связывается с неправильно свернутым/агрегированным TTR и не связывается с физиологическим тетрамером TTR.

Термины «комбинированная терапия»/ «комбинированное терапевтическое средство» или «комбинированное лечение», или «в комбинации», или «комбинированный фармацевтический продукт», используемые в настоящем документе, обозначают любую форму одновременного или параллельного лечения по меньшей мере двумя отдельными терапевтическими средствами, т. е. антителом к TTR и стабилизатором тетрамера TTR.

В контексте настоящей заявки «совместное введение» или «совместное лечение» с применением двух или более соединений определяется как введение двух или более соединений пациенту в течение определенного времени, обычно около 24 часов, включая раздельное введение двух лекарственных средств, каждое из которых содержит одно из соединений, а также одновременное введение, независимо от того, объединены ли два соединения в одном препарате или находятся в двух отдельных препаратах.

Под термином «терапевтически эффективное количество» или «клинически активная концентрация» вещества подразумевают, что данное вещество вводят субъекту, страдающему от состояния, в количестве, достаточном для обеспечения задержки, ослабления выраженности или частичной остановки состояния или одного или более его симптомов. Такое терапевтическое лечение может приводить к снижению степени тяжести симптомов заболевания или увеличению частоты или продолжительности периодов без проявления симптомов. Эффективные количества для данной цели и данного средства будут зависеть от степени тяжести заболевания или травмы, а также массы тела и общего состояния субъекта. В настоящей заявке термин «субъект» включает любое млекопитающее, предпочтительно человека. Терапевтическую эффективность и токсичность таких соединений можно определить посредством стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или на лабораторных животных, например, измеряя ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50 % популяции) и LD₅₀ (доза, летальная для 50 % популяции). Соотношение доз с терапевтическим и токсическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, который может быть выражен в виде соотношения LD₅₀/ED₅₀.

Кроме того, если не указано иное, термины и выражения, используемые в настоящем документе для характеристики настоящего изобретения, в частности, антитело к TTR, применяемое в комбинированном продукте по настоящему изобретению, даны в соответствии с определениями, приведенными в WO 2015/092077 A1, в частности, в подразделе «I. Определения» на стр. 16–42, содержание которого явным образом включено в настоящий документ посредством ссылки. То же самое применимо к общим вариантам реализации, раскрытым в WO 2015/092077 A1 для антител, фармацевтических композиций и т. д.

10

Фармацевтический продукт содержит по меньшей мере два различных компонента: антитело к TTR, которое специфически нацеливается на неправильно свернутый TTR человека и элиминирует фибриллы амилоидогенного TTR обычно благодаря присутствию активного домена Fc, который способен индуцировать антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ); и стабилизатор тетрамера TTR, такой как описан в публикациях Müller *et al.* (2020) и Gertz *et al.* (2019) (см. выше), который предпочтительно не обладает противовоспалительными свойствами. Как обсуждалось выше, антитело предпочтительно относится к классу или изотипу IgG1.

15

Как описано выше, первые эксперименты показали, что стабилизаторы тетрамера TTR не препятствуют связыванию антитела к TTR с амилоидогенным TTR. Соответственно, разумно ожидать, что любое антитело к TTR, которое способно специфически связываться с неправильно свернутым TTR, не нацелено на физиологические формы TTR и содержит активный домен Fc, подходит в качестве компонента для комбинированного терапевтического средства по настоящему изобретению.

25

Поскольку фармацевтический продукт по настоящему изобретению применяют для лечения ATTR у людей, в одном варианте реализации антитело к TTR является гуманизированным, предпочтительно человеческого происхождения и неиммуногенным у человека.

30

Как показано в разделе примеров, настоящее изобретение проиллюстрировано в качестве примера антителом NI-301.37F1 к TTR, которое способно связываться с эпитопом TTR человека, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности TTR_{41–}

45 (SEQ ID NO: 51 из WO 2015/092077 A1), и которое содержит в своей вариабельной области или связывающем домене определяющие комплементарность области (CDR) и вариабельную область тяжелой (V_H) и вариабельную область легкой (V_L) цепей, имеющие аминокислотные последовательности, изображенные на фиг. 1C и 1M
5 соответственно из WO 2015/092077 A1. Это антитело и родственные антитела были получены из репертуара В-клеток памяти от здоровых пожилых доноров-людей; см. описание примеров в WO 2015/092077 A1. Определение характеристик связывания антитела продемонстрировало, что оно обладает высокой аффинностью связывания с неправильно свернутым TTR в субнанолярном диапазоне концентраций, является
10 высокоселективным в отношении амилоидной конформации TTR и схожим образом связывается с wtTTR и vTTR. Поскольку это антитело человеческого происхождения является селективным в отношении неправильно свернутого TTR и, как проиллюстрировано в примерах, может вызывать элиминацию амилоида из сердца, оно представляет собой наиболее подходящее кандидатное терапевтическое средство для
15 комбинированного терапевтического средства по настоящему изобретению.

Однако в WO 2015/092077 A1 раскрыты дополнительные антитела человеческого происхождения, для которых удалось продемонстрировать связывание с тем же эпитопом TTR человека, что и в случае NI-301.37F1, т.е. антитела NI-301.28B3 и NI-
20 301.12D3, у которых V_H и V_L из тяжелой и легкой цепей имеют аминокислотные последовательности, изображенные (с указанием положения CDR) на фиг. 1E (для NI-301.28B3) и фиг. 1L (для NI-301.12D3) в WO 2015/092077 A1. Соответственно, антитело к TTR для применения в комбинированного терапевтического средства по настоящему изобретению может в целом характеризоваться связыванием эпитопа TTR человека,
25 который содержит или состоит из аминокислотной последовательности TTR₄₁₋₄₅ (SEQ ID NO: 51 из WO 2015/092077 A1). Следовательно, для получения таких антител нет необходимости прибегать к средствам и способам, раскрытым в WO 2015/092077 A1, с целью получения таких антител заново, но можно выполнить одну или более аминокислотных замен, которые не влияют на характеристики связывания антитела.
30 Кроме того, можно также применять любое из других антител человеческого происхождения, раскрытых в WO 2015/092077 A1.

Еще один класс антител к TTR, предположительно подходящий для комбинированного терапевтического средства по настоящему изобретению, описан в международных

- заявках компании Prothena Biosciences Limited (Prothena). В частности, компания Prothena сообщает об экспериментальном моноклональном антителе, разработанном для специфического нацеливания на неправильно свернутые (токсичные) формы амилоидного белка TTR, обнаруживаемые при ATTR, и для их элиминации, при этом
- 5 указанное антитело обозначено как PRX004 и в настоящее время изучается в исследовании I фазы у пациентов с ATTR (идентификатор на ClinicalTrials.gov: NCT03336580). Согласно презентации Джеффри Зондера (Jeffrey Zonder) из Института рака Карманоса, Детройт, представленной в 2018 году, антитело PRX004 соответствует гуманизированной версии антитела 14G8 и представляет собой гуманизированную
- 10 версию антитела 14G8, описанную в публикации Higaki *et al.*, Amyloid 23 (2016) 86-97 и раскрытую в WO 2016/120810 A1 и WO 2018/007922A2 и, в частности, в WO 2019/108689 A1. Соответственно, антитело PRX004 будет еще одним предпочтительным антителом к TTR для применения в комбинированном терапевтическом средстве по настоящему изобретению, среди прочих, которые распознают тот же эпитоп, что и PRX004, т. е.
- 15 аминокислоты TTR₈₉₋₉₇, или эпитоп, содержащий аминокислоты TTR₁₀₁₋₁₀₉, и которые являются гуманизированными версиями первоначально клонированных мышинных моноклональных антител 14G8, 9D5, 5A1, 6C1, раскрытыми в WO 2016/120810 A1, WO 2018/007924 A2, WO 2018/007924 A2 и WO 2018/007923 A1.
- 20 Дополнительное подходящее антитело представляет собой гуманизированную версию антитела 18C5 или выделенного моноклонального антитела, которое конкурирует за связывание с TTR человека с моноклональным антителом 18C5, предпочтительно которое связывается с тем же эпитопом на TTR человека, что и моноклональное антитело 18C5, где 18C5 представляет собой антитело мыши, характеризующееся зрелой
- 25 вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 81, и зрелой вариабельной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 87, как раскрыто в WO 2019/071205 A1.
- 30 Еще один класс гуманизированных антител к TTR, предположительно подходящих для комбинированного терапевтического средства по настоящему изобретению, описан в международных заявках института Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute и компании KM Biologics Co., Ltd., при этом указанные антитела распознают соответственно эпитоп, содержащий аминокислоты TTR₇₈₋₈₉ или TR₁₁₈₋₁₂₂, как раскрыто для антител 371M и

313M в WO 2015/115332 и для антитела, описанного в WO 2015/115331 A1 (которое обозначено в настоящем документе как XY для удобства ссылки).

Так как существуют две формы ATTR, а именно wtATTR и vATTR, которые вызваны патологической агрегацией wtTTR и vTTR соответственно, в предпочтительном варианте реализации антитело связывается с амилоидогенным wtTTR, а также с амилоидогенным vTTR. У людей всех возрастов с vATTR выявлено более 120 мутаций в гене TTR, но наиболее распространенными из них являются замены Val30Met и Val122Ile.

Замена Val30Met является эндемичной в некоторых регионах Португалии, Швеции и Японии и представляет собой наиболее частую мутацию, вызывающую ATTR-полинейропатию, которую ранее называли семейной амилоидной полинейропатией. Кроме того, токсичность TTR наблюдается вследствие мутации Val122Ile, которую с высокой частотой (3–5 %) обнаруживают в популяциях афроамериканцев и жителей Западной Африки. Данная мутация связана с ATTR-кардиомиопатией, ранее называемой семейной амилоидной кардиомиопатией, — заболеванием, при котором обширное накопление TTR в миокарде приводит к слабости сердечной мышцы и в конечном итоге к сердечной недостаточности (Ruberg *et al.*, *Circulation*. 126 (2012), 1286-1300).

Соответственно, в предпочтительном варианте реализации антитело к TTR связывается с эпитопом TTR, который не содержит аминокислоты Val122 и/или Val30, или антитело к TTR связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты Val122 и/или Val30, но замена аминокислот соответственно на Met и Ile не влияет на связывание антитела. В качестве альтернативы, антитело связывается с vTTR, несущим различные мутации, но, в частности, с vTTR, несущим мутацию Val122Ile и/или Val30Met.

Дополнительно, у 10–15 % индивидуумов в возрасте старше 65 лет обнаружены отложения TTR в сердце, вызванные wtATTR. Таким образом, в дополнительном варианте реализации антитело к TTR связывается с агрегированным wtTTR. Предпочтительно антитело к TTR связывается с wtTTR и vTTR, предпочтительно в одинаковой степени.

Как упоминалось выше, эксперименты, проиллюстрированные в примерах, выполняли с антителом NI-301.37F1, которое раскрыто в WO 2015/092077 A1 и связывается с эпитопом TTR, содержащим аминокислотную последовательность TTR₄₁₋₄₅, приведенную в SEQ ID NO: 51 из WO 2015/092077 A1. Соответственно, разумно
 5 ожидать, что дополнительные антитела, связывающиеся с эпитопом, содержащим указанную аминокислотную последовательность, также являются подходящим компонентом фармацевтического продукта по настоящему изобретению, например, антитела NI-301.28B3 и NI-301.12D3, также раскрытые в WO 2015/092077 A1.

10 Таким образом, в конкретном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения антитело к TTR происходит из антитела человека NI-301.37F1, NI-301.28B3 или NI-301.12D3 и характеризуется тем, что содержит в своей вариабельной области, т. е. связывающем домене, определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой (V_H) и вариабельной области легкой (V_L) цепи, имеющие
 15 аминокислотные последовательности, изображенные на фиг. 1C [NI-301.37F1], 1E [NI-301.28B3] или 1L [NI-301.12D3] в WO 2015/092077 A1, или при этом одна или более из CDR могут отличаться по их аминокислотной последовательности от тех, которые приведены на фиг. 1C, 1E или 1L в WO 2015/092077 A1, одной, двумя, тремя или даже более аминокислотами в случае CDR2 и CDR3, и при этом антитело демонстрирует по
 20 существу те же или идентичные характеристики, что и антитела NI-301.37F1, NI-301.28B3 или NI-301.12D3 к TTR, проиллюстрированные в примерах в WO 2015/092077 A1. Положения CDR показаны на фиг. 1C, 1E или 1L и объяснены в подписях к фиг. 1 в WO 2015/092077 A1. Соответствующие нуклеотидные последовательности приведены в таблице II на стр. 70 в WO 2015/092077 A1 для NI-301.37F1, на стр. 70–71 для NI-
 25 301.28B3 и на стр. 73 для NI-301.12D3. Дополнительно или в соответствии с другим вариантом, каркасные области или полная V_H и/или V_L тяжелой и легкой цепей на 80 % идентичны каркасным областям, приведенным на фиг. 1C или 1M [NI-301.37F1], 1E [NI-301.28B3] или 1L [NI-301.12D3] в WO 2015/092077 A1, предпочтительно на 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичны каркасным областям и V_H и/или V_L
 30 тяжелой и легкой цепей соответственно, приведенным на фиг. 1C или 1M, 1E или 1L в WO 2015/092077 A1. Дополнительно, были выполнены клонирование и экспрессия антител NI-301.37F1, NI-301.28B3 и NI-301.12D3, как описано в WO 2015/092077 A1 в примерах 1 и 2 на стр. 110–112, способы из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Таким образом, в одном варианте реализации антитело к TTR характеризуется присутствием CDR из V_H и V_L тяжелой и легкой цепей и полных областей V_H и V_L тяжелой и легкой цепей, изображенных на фиг. 1C и 1M соответственно в WO 2015/092077 A1. Таким образом, антитело предпочтительно содержит:

(i) переменную область (V_H) тяжелой цепи, содержащую следующие определяющие комплементарность области (CDR) 1, 2 и 3 из V_H , и/или переменную область (V_L) легкой цепи, содержащую следующие CDR 1, 2 и 3 из V_L :

(a) VH -CDR1: положения 31–35 последовательности SEQ ID NO: 10 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;

(b) VH -CDR2: положения 52–67 последовательности SEQ ID NO: 10 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;

(c) VH -CDR3: положения 100–109 последовательности SEQ ID NO: 10 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;

(d) VL -CDR1: положения 24–34 последовательности SEQ ID NO: 12 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;

(e) VL -CDR2: положения 50–56 последовательности SEQ ID NO: 12 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены; и

(f) VL -CDR3: положения 89–97 последовательности SEQ ID NO: 12 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены; и/или

(ii) V_H тяжелой цепи и/или V_L легкой цепи, где:

(a) V_H тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10 или 53, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или более аминокислотных замен; и

(b) V_L легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или более аминокислотных замен;

при этом предпочтительно указанная аминокислотная последовательность V_H и V_L тяжелой и легкой цепей по меньшей мере на 90 % идентична последовательности SEQ ID NO: 10 или 53 и 12 соответственно.

Этот предпочтительный вариант реализации изобретения, т. е. применение антитела NI-301.37F1 и его эквивалентов, проиллюстрированный в примерах, соответствует варианту реализации изобретения, охарактеризованному в п. 4 формулы изобретения, где дана ссылка на аминокислотные последовательности, указанные в представленном здесь перечне последовательностей.

В одном из вариантов реализации антитело к TTR характеризуется наличием областей CDR из V_H и/или V_L тяжелой и легкой цепей и полной областью V_H и V_L тяжелой и легкой цепей, представленными соответственно на фиг. 1E в WO 2015/092077 A1. Таким образом, антитело предпочтительно содержит:

- (i) вариабельную область (V_H) тяжелой цепи, содержащую следующие определяющие комплементарность области (CDR) 1, 2 и 3 из V_H , и/или вариабельную область (V_L) легкой цепи, содержащую следующие CDR 1, 2 и 3 из V_L :
 - (a) VH -CDR1: положения 31–37 последовательности SEQ ID NO: 18 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;
 - (b) VH -CDR2: положения 52–67 последовательности SEQ ID NO: 18 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;
 - (c) VH -CDR3: положения 100–116 последовательности SEQ ID NO: 18 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;
 - (d) VL -CDR1: положения 24–34 последовательности SEQ ID NO: 20 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;
 - (e) VL -CDR2: положения 50–56 последовательности SEQ ID NO: 20 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены; и

- (f) VL-CDR3: положения 89–98 последовательности SEQ ID NO: 20 в WO 2015/092077 A1, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены; и/или
- (ii) V_H тяжелой цепи и/или V_L легкой цепи, где:
- 5 (a) V_H тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или более аминокислотных замен; и
- (b) V_L легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, или ее вариант, при этом указанный
- 10 вариант содержит одну или более аминокислотных замен;
- при этом предпочтительно указанная аминокислотная последовательность V_H и V_L тяжелой и легкой цепей по меньшей мере на 90 % идентична последовательности SEQ ID NO: 18 и 20 соответственно.
- 15 В одном из вариантов реализации антитело к TTR характеризуется наличием областей CDR из V_H и/или V_L тяжелой и легкой цепей и полной областью V_H и V_L тяжелой и легкой цепей, представленными соответственно на фиг. 1E в WO 2015/092077 A1. Таким образом, антитело предпочтительно содержит:
- (i) вариабельную область (V_H) тяжелой цепи, содержащую следующие
- 20 определяющие комплементарность области (CDR) 1, 2 и 3 из V_H , и/или вариабельную область (V_L) легкой цепи, содержащую следующие CDR 1, 2 и 3 из V_L :
- (a) VH-CDR1: положения 31–35 последовательности SEQ ID NO: 46 в WO 2015/092077 A1 или их вариант, при этом указанный вариант содержит
- 25 одну или две аминокислотные замены;
- (b) VH-CDR2: положения 50–66 последовательности SEQ ID NO: 46 в WO 2015/092077 A1 или их вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;
- (c) VH-CDR3: положения 99–108 последовательности SEQ ID NO: 46 в WO
- 30 2015/092077 A1 или их вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;
- (d) VL-CDR1: положения 23–36 последовательности SEQ ID NO: 48 в WO 2015/092077 A1 или их вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены;

- (e) VL-CDR2: положения 52–58 последовательности SEQ ID NO: 48 в WO 2015/092077 A1 или их вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены; и
- (f) VL-CDR3: положения 91–100 последовательности SEQ ID NO: 48 в WO 2015/092077 A1 или их вариант, при этом указанный вариант содержит одну или две аминокислотные замены; и/или
- (ii) V_H тяжелой цепи и/или V_L легкой цепи, где:
 - (a) V_H тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или более аминокислотных замен; и
 - (b) V_L легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, или ее вариант, при этом указанный вариант содержит одну или более аминокислотных замен; при этом предпочтительно указанная аминокислотная последовательность V_H и V_L тяжелой и легкой цепей по меньшей мере на 90 % идентична последовательности SEQ ID NO: 46 и 48 соответственно.

Однако предпочтительно в качестве одного компонента в комбинированном терапевтическом средстве по настоящему изобретению применяют антитело NI-301.37F1.

Как упоминалось ранее, антитело к TTR содержит человеческий константный домен с активным доменом Fc и имеет формат IgG, т. е. представляет собой полное антитело IgG, предпочтительно антитело или изотип IgG1. Рекомбинантная экспрессия полных антител IgG1 человека с человеческим константным доменом может быть осуществлена по существу так, как описано, например, в публикации Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988) First edition; Second edition by Edward A. Greenfield, Dana-Farber Cancer Institute © 2014, ISBN 978-1-936113-81-1 и в примерах в WO 2012/080518 A1.

Как упоминалось выше, ATTR может существовать в форме либо wtATTR, либо vATTR, и, таким образом, предпочтительным является подход, подходящий для лечения обоих вариантов. Поскольку, как описано выше, антитело к TTR связывается как с агрегированным wtTTR, так и с агрегированным vTTR, второй компонент в

комбинированного терапевтического средства по настоящему изобретению предпочтительно стабилизирует обе формы TTR в физиологически функциональных тетрамерах.

5 Большинство лекарственных средств, доступных в настоящее время на рынке для лечения ATTR, были одобрены для лечения vATTR-полинейропатии, например, инотерсен и патисиран, но эффективность при лечении vATTR и wtATTR была показана только для тафамидиса и дифлунизала (см. публикацию Müller *et al.* (2020) выше); при этом тафамидис был одобрен Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) и Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для лечения ATTR-полинейропатии и ATTR-кардиомиопатии. 10 Дополнительно, AG10 представляет собой новый мощный и селективный пероральный стабилизатор тетрамера TTR, который разрабатывается для лечения wtATTR и vATTR; см. публикацию Fox *et al.*, Clinical Pharmacology in Drug Development 9 (2020), 115-129. Таким образом, только стабилизаторы тетрамера TTR одобрены для клинического 15 применения при лечении vATTR и wtATTR и, в случае AG10, обладают высоким потенциалом для получения соответствующего одобрения.

Соответственно, в одном варианте реализации комбинированная терапия/комбинированное терапевтическое средство по настоящему изобретению 20 дополнительно содержит один или два стабилизатора тетрамера TTR, предпочтительно один стабилизатор тетрамера TTR, который способен стабилизировать тетрамеры wtTTR и тетрамеры vTTR.

Как упоминалось выше, стабилизаторы тетрамера TTR блокируют диссоциацию 25 тетрамера — скорость-лимитирующий этап в амилоидогенном процессе, и уменьшают отложение амилоида *de novo*. В 1996 году впервые было показано, что связывание лиганда с любым из сайтов связывания тироксина или ретинол-связывающего белка на TTR стабилизирует его тетрамерную структуру и надежно предотвращает диссоциацию TTR. Таким образом, комбинированная терапия/комбинированное терапевтическое 30 средство по настоящему изобретению включает стабилизатор тетрамера TTR, который связывается с любым из сайтов связывания тироксина или ретинол-связывающего белка на тетрамере TTR.

В предпочтительном варианте реализации стабилизатор тетрамера TTR представляет собой тафамидис (регистрационный номер Cas: 594839-88-0). Тафамидис является членом класса 1,3-бензоксазолов, который представляет собой 1,3-бензоксазол-6-карбоновую кислоту, в которой водород в положении 2 заменен на 3,5-дихлорфенильную группу. Тафамидис структурно схож с дифлунизалом, но, в отличие от дифлунизала, не является НПВП.

В дополнительном варианте реализации комбинированная терапия/комбинированное терапевтическое средство по настоящему изобретению содержит вместе с антителом к TTR стабилизатор тетрамера TTR AG10. AG10 представляет собой 3-(3-(3,5-диметил-1H-пиразол-4-ил)пропокси)-4-фторбензойную кислоту (регистрационный номер Cas: 1446711-81-4) и раскрыт, например, в патенте США 9169214 B2, где он обозначен как соединение VIIc. AG10 является мощным высокоселективным низкомолекулярным стабилизатором тетрамера TTR. Его получают путем простого синтеза, и его фармацевтические свойства включают хорошую биодоступность при пероральном приеме, высокую селективность связывания и способность стабилизировать TTR. AG10 был разработан для имитации структурного влияния защитной мутации в TTR — T119M. По сравнению с другими известными стабилизаторами, AG10 отличается своей способностью образовывать водородные связи с теми же остатками серина в положении 117, которые стабилизируют вариант белка с мутацией T119M. Уже были проведены первые клинические исследования, и показано, что AG10 может быть безопасным и эффективным средством для лечения пациентов с vATTR или wtATTR (Fox *et al.*, *Clinical Pharmacology in Drug Development* 9 (2020), 115-129). В частности, в клинических исследованиях II фазы продемонстрирована его эффективность для лечения пациентов с ATTR-кардиомиопатией (Judge *et al.*, *J Am Coll Cardiol* 74 (2019), 285-295). Тем не менее, логично ожидать, что он также будет действовать и у пациентов с ATTR-полинейропатией.

В дополнительном варианте реализации комбинированное терапевтическое средство по настоящему изобретению содержит вместе с антителом к TTR стабилизатор тетрамера TTR дифлунизал. Дифлунизал является нестероидным противовоспалительным препаратом (НПВП) и описан в публикации Müller *et al.*, *European Journal of Heart Failure* 22 (2020), pages 39-53.

- Антитело к TTR как часть комбинированного терапевтического средства/комбинированной терапии по настоящему изобретению может быть приготовлено в виде препарата (формы) в соответствии со способами, хорошо известными в данной области техники; см., например, публикацию Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны специалистам в данной области техники и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих средств, стерильные растворы и т. д. Композиции, содержащие такие носители, могут быть приготовлены в виде препаратов с применением хорошо известных общепринятых методов. Эти фармацевтические композиции могут быть введены субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций может быть осуществлено различными путями, например, внутривенным, интраперитонеальным, подкожным, внутримышечным, интраназальным, местным или интрадермальным введением или посредством доставки в спинной или головной мозг. Аэрозольные формы, такие как препараты в форме назального спрея, включают очищенные водные или другие растворы активного средства с консервирующими средствами и изотоническими средствами. Такие препараты предпочтительно доводят до значения pH и изотонического состояния, которые совместимы со слизистыми оболочками полости носа. Формы для ректального или вагинального введения могут быть представлены в форме суппозитория с подходящим носителем. В предпочтительном варианте реализации антитело к TTR изготавливают в форме жидкого препарата, предназначенного для введения внутривенно (в/в) или подкожно (п/к).
- Режим введения доз будет определен лечащим врачом с учетом клинических факторов. Как хорошо известно специалистам в области медицины, выбор дозы для любого пациента зависит от множества факторов, включая размер, площадь поверхности тела, возраст пациента, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, которые вводят одновременно.
- Как правило, доза может варьировать, например, от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг, и более часто от 0,01 до 5 мг/кг (например, 0,02 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг и т. д.) в расчете на массу тела получающего лечение субъекта. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, либо могут находиться в диапазоне от 1 до 10 мг/кг, предпочтительно составлять по меньшей мере

1 мг/кг. Дозы, которые являются промежуточными в вышеуказанных диапазонах, также включены в объем настоящего изобретения. Субъектам могут вводить такие дозы ежедневно, через день, еженедельно или в соответствии с любым другим режимом, определенным в результате эмпирического анализа. Пример лечения предусматривает введение многократных доз в течение длительного периода, например, по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные примеры режимов лечения предусматривают введение один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз в 3–6 месяцев. Примеры режимов введения доз включают 1–10 мг/кг или 15 мг/кг ежедневно в последовательные дни, 30 мг/кг через день или 60 мг/кг еженедельно. Прогресс можно наблюдать посредством периодической оценки.

Может ли антитело к TTR для применения в по настоящему изобретению быть терапевтически эффективным или нет, можно определить с помощью животной модели PDAX, описанной в примере 4 в WO 2020/094883 A1. Предпочтительно антитело к TTR является эффективным при введении в дозе по меньшей мере 0,5 мг/кг, предпочтительно в дозе 5 или 50 мг/кг или в любой дозе между этими значениями. Более предпочтительно антитело вводят в дозе примерно 3, 10, 30 или 60 мг/кг или в любой дозе между этими значениями каждые две–четыре недели.

Что касается стабилизаторов тетрамера TTR, предпочтительно в комбинированном терапевтическом средстве по настоящему изобретению применяют тафамидис, дифлунизал и/или AG10. В настоящее время доступны два препарата, а именно тафамидиса меглюмин и тафамидис, оба из которых имеют одно и то же активное вещество — тафамидис. Стабилизаторы тетрамера TTR предпочтительно вводят в клинически активной концентрации.

Тафамидиса меглюмин, вводимый в дозе 80 мг один раз в сутки (4 капсулы × 20 мг), одобрен в Соединенных Штатах Америки, Японии, Канаде и Бразилии для лечения wtATTR- и vATTR-кардиомиопатии у взрослых. Для удобства пациентов была разработана и выведена на рынок альтернативная твердая лекарственная форма для перорального приема одной капсулы (капсулы тафамидиса 61 мг в форме свободной кислоты) (одобрена в Соединенных Штатах Америки, Объединенных Арабских Эмиратах и Европейском союзе); см. публикацию Lockwood *et al.*, Clin. Pharmacol. Drug Dev., 2020 Mar 20. doi: 10.1002/cpdd.789, а также информацию о лекарственном

препарате, предоставленную FDA в отношении препаратов ВИНДАКЕЛЬ (VYNDAQEL[®], тафамидиса меглюмин) и ВИНДАМЭКС (VYNDAMAX[™], тафамидис). Кроме того, тафамидиса меглюмин, принимаемый в дозе 20 мг один раз в сутки (что соответствует 12,2 мг тафамидиса), одобрен в более чем 40 странах мира для лечения

5 взрослых с ранней стадией симптоматической wtATTR- и vATTR-полинейропатии; см. публикацию Lockwood *et al.* 2002 и информацию о препарате, предоставленную ЕМА в отношении препарата ВИНДАКЕЛЬ (VYNDAQEL[®]).

Таким образом, в одном из вариантов реализации тафамидис предназначен для введения

10 в дозе 20 мг один раз в сутки в виде тафамидиса меглюмина или в дозе 12,2 мг один раз в сутки в виде тафамидиса, предпочтительно при этом указанную дозу вводят пациентам с симптоматической wtATTR- и vATTR-полинейропатией.

В одном из вариантов реализации тафамидис предназначен для введения в дозе 80 мг

15 один раз в сутки в виде тафамидиса меглюмина или в дозе 61 мг один раз в сутки в виде тафамидиса, предпочтительно при этом указанную дозу вводят пациентам с симптоматической wtATTR- и vATTR-кардиомиопатией.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения тафамидис или

20 тафамидиса меглюмин предназначены для введения в дозе 1, 5, 15 или 30 мг/кг/сут или в любой дозе между этими значениями.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения дифлунизал вводят в дозе до 250 мг один или два раза в сутки.

25 AG10 еще не одобрен регуляторными органами, но результаты первых клинических исследований уже свидетельствуют, что AG10 эффективен при однократном введении в дозе 50, 150, 300, 400 или 800 мг. Предпочтительно применяют одну однократную дозу 300 мг или 800 мг; см. публикации Fox *et al.* 2020 и Judge *et al.* 2019. В одном из

30 вариантов реализации настоящего изобретения AG10 вводят в дозе 50, 150, 300, 400 или 800 мг, предпочтительно 400 мг или 800 мг, предпочтительно два раза в сутки. Разумеется, дозы между этими значениями также включены в настоящее изобретение.

В одном из вариантов реализации комбинированного терапевтического средства по настоящему изобретению антитело к TTR и стабилизатор тетрамера TTR представлены в форме фармацевтического продукта, при этом они обычно находятся в разных контейнерах. Как упоминалось выше, антитело к TTR предпочтительно представляет собой жидкий препарат, предназначенный для внутривенного введения. Таким образом, в случае антитела к TTR контейнер предпочтительно представляет собой предварительно заполненный шприц, шприц-ручку, ампулу, флакон, автоинъектор или инфузионный мешок. В дополнительном предпочтительном варианте реализации контейнер представляет собой инфузионный флакон или мешок.

В отличие от этого, стабилизатор тетрамера TTR предпочтительно изготавливают в форме для перорального введения, и он предпочтительно присутствует в таблетке или капсуле, как описано выше.

Следовательно, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическому продукту, который содержит антитело к TTR и стабилизатор тетрамера TTR, как определено выше, с упомянутыми предпочтениями, в частности, при этом указанное антитело способно облегчать элиминацию амилоидогенного TTR благодаря наличию активного домена Fc и способно индуцировать антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ), а стабилизатор по существу лишен противовоспалительных свойств.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения отдельные компоненты фармацевтического продукта по настоящему изобретению, т. е. по меньшей мере антитело к TTR и стабилизатор тетрамера TTR, присутствуют в одной композиции, при этом препарат и режим введения доз должны быть адаптированы таким образом, чтобы оба компонента оставались стабильными и были фармацевтически активными. Этот вариант реализации может быть полезным в таких клинических ситуациях, как внезапная остановка сердца или инсульт, где в качестве первой помощи может быть рассмотрена необходимость одновременного введения двух лекарственных средств.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая упаковка или комплект, содержащие один или более контейнеров, наполненных по меньшей мере двумя из вышеописанных ингредиентов, т. е. антителом к TTR и стабилизатором тетрамера TTR.

К такому(-им) контейнеру(-ам) может прилагаться указание в форме, предусмотренной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу лекарственных средств или биологических продуктов, при этом данное указание отражает факт одобрения органом, регулирующим производство, применение или продажу, для введения человеку. Фармацевтический продукт по настоящему изобретению, предпочтительно в форме комплекта, безусловно, особенно подходит для лечения заболевания или нарушения, которое сопровождается наличием мутантного, неправильно свернутого, неправильно собранного и/или агрегированного TTR, и, в частности, может применяться для лечения нарушений, для которых обычно характерен ATTR и которые более подробно описаны ниже. В соответствии с другим вариантом, фармацевтический продукт, фармацевтическая упаковка или комплект по настоящему изобретению могут не содержать любой один из компонентов, но содержать только антитело к TTR и только стабилизатор тетрамера TTR, а вместо другого компонента — подробные инструкции по применению фармацевтического продукта, фармацевтической упаковки или комплект в комбинированном терапевтическом средстве по изобретению.

В одном из вариантов реализации комбинированная терапия или фармацевтический продукт по настоящему изобретению могут содержать не только один стабилизатор тетрамера TTR, но могут содержать более одного, например, два стабилизатора тетрамера TTR. В одном из вариантов реализации указанный фармацевтический продукт содержит тафамидис и AG10.

Фармацевтический продукт по настоящему изобретению может быть применен в способе лечения ATTR у субъекта, т. е. в комбинированном терапевтическом средству. Таким образом, настоящее изобретение относится к комбинированному терапевтическому средству, включающей введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтического продукта по настоящему изобретению.

30

В одном из вариантов реализации перед введением антитела к TTR и стабилизатора тетрамера TTR и фармацевтического продукта по настоящему изобретению соответственно определяют наличие и уровень амилоидогенного TTR. В предпочтительном варианте реализации может быть применено любое подходящее

антитело к TTR, которое предпочтительно связывается с агрегированным TTR, а не физиологическим TTR. Например, для диагностики можно применять антитела, раскрытые в WO 2015/092077 A1, предпочтительно антитела NI-301.37F1, NI-301.28B3 или NI-301.12D3, наиболее предпочтительно NI-301.37F1. Кроме того, можно применять антитела, упомянутые выше, т. е. 14G8, 18C5, 9D5, 5A1, 6C1, XY, 371M или 313M. Определение количества амилоидогенного TTR предпочтительно проводят в образце (биологической жидкости), полученном от субъекта, подлежащего лечению.

Как упоминалось выше, в одном из вариантов реализации фармацевтический продукт представлен в одной фармацевтической композиции. Таким образом, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения оба компонента, т. е. антитело к TTR и стабилизатор тетрамера TTR, вводят одновременно. Это имеет особое значение для комбинации антитела к TTR с AG10, так как оба компонента предпочтительно вводят в виде однократной дозы.

Предпочтительно фармацевтический продукт представлен в виде комплекта в отдельных контейнерах. Таким образом, в одном из вариантов реализации комбинированная терапия по настоящему изобретению, способ лечения ATTR включает либо введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к TTR и одновременное или последующее введение субъекту терапевтически эффективного количества стабилизатора тетрамера TTR, либо введение субъекту терапевтически эффективного количества стабилизатора тетрамера TTR и одновременное или последующее введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к TTR. Предпочтительно одновременное или последующее лечение проводят, пока первое лекарственное средство все еще присутствует в организме человека, например, в плазме, в значительной концентрации, например, с учетом периода полувыведения лекарственного средства.

Как показано в примере 2, антитело к TTR, такое как описано выше, индуцирует элиминацию фибрилл TTR *in vivo*. Таким образом, пациенту с ATTR, который уже получает лечение одним или более стабилизаторами тетрамера TTR с целью предотвращения образования большего количества склонных к агрегации мономеров TTR, может быть дополнительно введено антитело к TTR. Это оказывает благоприятное действие, так как в дополнение к предотвращению образования мономеров TTR будут элиминированы уже существующие фибриллы TTR. Как упоминалось выше,

стабилизаторы тетрамера TTR наиболее эффективны при лечении заболеваний на ранней стадии, поскольку эти фармацевтические средства не элиминируют уже существующие фибриллы TTR, а только предотвращают образование склонных к агрегации мономеров TTR. Например, тафамидис одобрен ЕМА для лечения АТТН-полинейропатии 1-й стадии. Таким образом, когда пациенты, которые уже получают лечение стабилизатором тетрамера TTR, дополнительно получают лечение антителом к TTR, логично ожидать, что это эффективно даже при лечении пациентов с АТТН на более поздней стадии. И наоборот, пациенту с АТТН, который уже получает лечение антителом к TTR, которое индуцирует элиминацию фибрилл TTR, может быть дополнительно введен стабилизатор тетрамера TTR, такой как описан выше, для предотвращения образования новых мономеров TTR, которые имеют склонность к агрегации.

Соответственно, в одном варианте реализации настоящего изобретения антитело к TTR применяют в способе лечения АТТН у субъекта, который получает лечение стабилизатором тетрамера TTR.

В другом варианте реализации стабилизатор тетрамера TTR применяют в способе лечения АТТН у субъекта, который получает лечение антителом к TTR. Другими словами, настоящее изобретение относится к способу лечения АТТН путем индуцирования или стимулирования элиминации фибрилл АТТН посредством антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), включающему введение нуждающемуся в этом субъекту, т. е. пациенту, антитела к TTR и стабилизатора тетрамера TTR. В одном варианте реализации антитело к TTR представляет собой антитело согласно определению, приведенному в этом документе выше, и/или стабилизатор тетрамера TTR представляет собой стабилизатор согласно определению, приведенному в этом документе выше. Антитело и стабилизатор могут быть введены одновременно, один за другим или последовательно.

В данном контексте термин «субъект, который получает лечение» стабилизатором TTR или антителом к TTR, включает в себя одновременное лечение, а также последовательное лечение при условии, что первое лекарственное средство все еще присутствует в организме человека, например, в плазме, в значительной концентрации, например, с учетом периода полувыведения лекарственного средства. Например, поскольку средний период полувыведения тафамидиса составляет приблизительно

49 часов, введение антитела к TTR через 48 часов после последней дозы тафамидиса будет рассматриваться в качестве варианта реализации настоящего изобретения. С другой стороны, если субъект получает лечение вторым лекарственным средством, например, антителом к TTR, после того как первое лекарственное средство, например, тафамидис, разлагается или выводится, и в организме больше нет эффективного или поддающегося обнаружению количества первого лекарственного средства, то такое лечение может не быть вариантом реализации настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте реализации антитело к TTR вводят путем внутривенной инфузии, а стабилизатор тетрамера TTR вводят перорально.

Как уже объяснялось выше, комбинированная терапия/комбинированное терапевтическое средство подходит для лечения wtATTR и vATTR, поскольку как стабилизатор тетрамера TTR, так и антитело к TTR связываются с wtTTR и vTTR и соответствующими агрегированными формами TTR соответственно. В этом контексте следует отметить, что vATTR ранее был известен как наследственный/мутантный ATTR. ATTR представляет собой аутосомно-доминантное расстройство и связан с различными заболеваниями или состояниями, которые выбраны из группы, состоящей из ATTR-кардиомиопатии, семейной амилоидной полинейропатии (САП) (также известной как TTR-полинейропатия), старческого системного амилоидоза (ССА), системного семейного амилоидоза, лептоменингеального амилоидоза/амилоидоза центральной нервной системы (ЦНС), включая болезнь Альцгеймера, связанного с TTR амилоидоза глаз, связанного с TTR амилоидоза почек, связанной с TTR гипертироксинемии, связанного с TTR амилоидоза связок, включая синдром запястного канала, разрывы ротаторной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела, и презкламписии.

Таким образом, в одном варианте реализации настоящего изобретения фармацевтический продукт и комбинированную терапию соответственно по настоящему изобретению, а также антитело к TTR и стабилизатор тетрамера TTR при введении пациенту, который уже получает лечение, применяют для лечения любого из указанных выше заболеваний.

- В предпочтительном варианте реализации заболевание является ATTR-кардиомиопатией. ATTR-кардиомиопатия представляет собой возраст-ассоциированное заболевание сердца, характеризующееся интрамиокардиальным отложением неправильно свернутого и агрегированного TTR. Вызывающие болезнь амилоидные отложения в сердце могут состоять либо из wtTTR, либо из vTTR, причем последние связаны с многочисленными мутациями в гене TTR. Накопление амилоида приводит к увеличению толщины стенок желудочков и оказывает серьезное негативное воздействие на функцию сердца и выживаемость. Заболевание проявляется преимущественно у мужчин в возрасте ≥ 60 лет и может быть диагностировано с помощью эхокардиографии, сцинтиграфии и биопсии. Распространенность этого заболевания в настоящее время неизвестна, несмотря на тот факт, что средства диагностики широко доступны. Подсчитано, что сегодня заболевание диагностируется только у 1 % пациентов или менее.
- Существуют различные стадии ATTR, т. е. ранняя, поздняя стадия заболевания или заболевание с поздним началом. Логично ожидать, что фармацевтический продукт по настоящему изобретению, т. е. комбинированная терапия, подходит для лечения пациентов с ATTR на ранней стадии заболевания, а также пациентов с ATTR на поздней стадии или с поздним началом. В частности, как упоминалось выше, антитело к TTR эффективно элиминирует фибриллы TTR из пораженной ткани и, таким образом, даже на поздней стадии заболевания можно ожидать, что пораженная ткань и соответствующий орган, которым в случае ATTR-кардиомиопатии является сердце, восстановятся после лечения антителом к TTR. В то же время стабилизатор тетрамера TTR предотвращает образование новых агрегированных видов TTR, поэтому благоприятное влияние на здоровье пациента является весьма вероятным.

Хотя, конечно, любое антитело к TTR, направленное на неправильно свернутый TTR, которое способно облегчать элиминацию амилоидогенного TTR, и любой стабилизатор тетрамера TTR могут быть объединены в фармацевтический продукт по настоящему изобретению, следующие комбинации являются предпочтительными:

- Антитело NI-301.37F1 с тафамидисом
- Антитело NI-301.28B3 с тафамидисом
- Антитело NI-301.12D3 с тафамидисом
- Антитело 14G8 с тафамидисом

- Антитело 18C5 с тафамидисом
- Антитело 9D5 с тафамидисом
- Антитело 5A1 с тафамидисом
- Антитело 6C1 с тафамидисом
- 5 • Антитело XY с тафамидисом
- Антитело 371M с тафамидисом
- Антитело 313M с тафамидисом
- Антитело NI-301.37F1 с AG10
- Антитело NI-301.28B3 с AG10
- 10 • Антитело NI-301.12D3 с AG10
- Антитело 14G8 с AG10
- Антитело 18C5 с AG10
- Антитело 9D5 с AG10
- Антитело 5A1 с AG10
- 15 • Антитело 6C1 с AG10
- Антитело XY с AG10
- Антитело 371M с AG10
- Антитело 313M с AG10
- Антитело NI-301.37F1 с дифлунизалом
- 20 • Антитело NI-301.37F1 с дифлунизалом
- Антитело NI-301.28B3 с дифлунизалом
- Антитело NI-301.12D3 с дифлунизалом
- Антитело 14G8 с дифлунизалом
- Антитело 18C5 с дифлунизалом
- 25 • Антитело 9D5 с дифлунизалом
- Антитело 5A1 с дифлунизалом
- Антитело 6C1 с дифлунизалом
- Антитело XY с дифлунизалом
- Антитело 371M с дифлунизалом
- 30 • Антитело 313M с дифлунизалом
- Антитело NI-301.37F1 с тафамидисом и AG10
- Антитело NI-301.28B3 с тафамидисом и AG10
- Антитело NI-301.12D3 с тафамидисом и AG10

- Антитело 14G8 с тафамидисом и AG10
 - Антитело 18C5 с тафамидисом и AG10
 - Антитело 9D5 с тафамидисом и AG10
 - Антитело 5A1 с тафамидисом и AG10
 - 5 • Антитело 6C1 с тафамидисом и AG10
 - Антитело XY с тафамидисом и AG10
 - Антитело 371M с тафамидисом и AG10
 - Антитело 313M с тафамидисом и AG10
- 10 Конкретный предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой комбинацию антитела NI-301.37F1 с тафамидисом.

Хотя, конечно, каждая комбинация может быть применена для лечения ATTR в целом, каждая комбинация может быть применена для лечения ATTR-кардиомиопатии и/или ATTR-полинейропатии:

- Антитело NI-301.37F1 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело NI-301.37F1 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 20 • Антитело NI-301.28B3 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело NI-301.28B3 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело NI-301.12D3 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- 25 • Антитело NI-301.12D3 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 14G8 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 14G8 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 30 • Антитело 18C5 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 18C5 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 9D5 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 9D5 с тафамидисом для применения в лечении ATTR-полинейропатии

- Антитело NI-301.37F1 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело NI-301.37F1 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 5 • Антитело NI-301.28B3 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело NI-301.28B3 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 10 • Антитело NI-301.12D3 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело NI-301.12D3 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 14G8 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 14G8 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 15 • Антитело 18C5 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 18C5 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 9D5 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 9D5 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 5A1 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- 20 • Антитело 5A1 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 6C1 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 6C1 с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело XY с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело XY с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 25 • Антитело 371M с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 371M с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 313M с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 313M с дифлунизалом для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело NI-301.37F1 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- 30 • Антитело NI-301.37F1 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии

- Антитело NI-301.28B3 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело NI-301.28B3 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 5 • Антитело NI-301.12D3 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело NI-301.12D3 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 10 • Антитело 14G8 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 14G8 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 18C5 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- 15 • Антитело 18C5 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 9D5 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 9D5 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 20 • Антитело 5A1 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 5A1 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- 25 • Антитело 6C1 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- Антитело 6C1 с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело XY с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- 30 • Антитело XY с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии
- Антитело 371M с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии

- Антитело 371M с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-полинейропатии
 - Антитело 313M с тафамидисом и AG10 для применения в лечении ATTR-кардиомиопатии
- 5 • Антитело 313M с тафамидисом и AG10 или применение для лечения ATTR-полинейропатии

Конкретный предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой комбинацию антитела NI-301.37F1 с тафамидисом для применения

10 в лечении ATTR-кардиомиопатии.

Несомненно, когда речь идет о вышеупомянутых антителах, подразумевается, что их полностью человеческая или гуманизованная версия, соответственно, включает соответствующие человеческие, гуманизованные и подобные человеческим антитела,

15 которые конкурируют с указанным эталонным антителом за связывание с неправильно свернутым/агрегированным TTR человека.

По тексту настоящего описания изобретения цитируются некоторые документы. Содержание всех цитируемых источников (включая литературные источники, выданные патенты, опубликованные заявки на патент, ссылки на которые содержатся по всему

20 тексту настоящей заявки, включая раздел «Уровень техники» и спецификации производителя, инструкции и т. д.) явным образом включено в настоящую заявку посредством ссылки; однако это не является признанием того, что любой цитируемый документ в действительности представляет информацию об известном уровне техники

25 для настоящего изобретения.

Более полное понимание может быть получено на основании следующего конкретного примера реализации, который предложен в настоящем документе исключительно с иллюстративной целью и не предназначен для ограничения объема изобретения.

ПРИМЕРЫ

Материалы и методы

Агрегаты белка TTR

Человеческий белок TTR дикого типа, полученный посредством очистки из плазмы человека, и белки TTR дикого типа и мутантные белки TTR, полученные посредством рекомбинантной экспрессии, применяли как в нативной, так и в неправильно свернутой/агрегированной конформациях для обнаружения антител, нацеленных на TTR. Неправильно свернутая/агрегированная конформации были получены *in vitro* в кислых условиях с применением процедуры, подобной таковой, описанной в публикации Colon W. *et al*, Biochemistry, 31 (1992), 8654-8660, с незначительными модификациями. Очищенный из плазмы wtTTR получали в виде раствора с концентрацией 2 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS).

Антитело к TTR

Химерное мышинное антитело ch.NI-301.37F1 было получено на основе моноклонального антитела человеческого происхождения NI-301.37F1, раскрытого в международной заявке WO 2015/092077 A1. Химерный мышинный вариант был разработан таким образом, чтобы он содержал переменные домены человеческого антитела NI-301.37F1 в остовах константного домена мышинного антитела. В частности, аминокислотные последовательности переменной области тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей моноклонального антитела человеческого происхождения NI-301.37F1 раскрыты в WO 2015/092077 A1 на фиг. 1, при этом соответственно SEQ ID NO: 10 и 53 соответствуют SEQ ID NO: 2 и 6 в представленном здесь перечне последовательностей для V_H тяжелой цепи и SEQ ID NO: 12 соответствует SEQ ID NO: 4 в представленном здесь перечне последовательностей для V_L легкой цепи, в то время как мышинный константный домен тяжелой цепи соответствует записи Uniprot P01863 и мышинный константный домен легкой цепи соответствует записи Uniprot P01837. Вкратце, синтез генов применили для получения синтетического гена тяжелой цепи, содержащего последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи из человеческого антитела NI-301.37F1, за которой следовала последовательность, кодирующая константный домен тяжелой цепи мышинного IgG2a (см. последовательность mur.37F1 H), и синтетического гена легкой цепи, содержащего последовательность, кодирующую переменную область цепи из человеческого антитела NI-301.37F1, за которой следовала последовательность, кодирующая константный домен мышинной легкой цепи каппа (см.

mur.37F1 L). Затем эти 2 гена субклонировали в подходящие экспрессионные векторы, которые применили для трансфекции клеток CHO. Антитело ch.NI-301.37F1 очищали из культуральной питательной среды с применением стандартных способов, описанных в WO 2015/092077 A1, включая очистку антитела с помощью хроматографии на колонке с белком А.

Стабилизаторы тетрамера TTR

Тафамидис (ММ: 308,1 г/моль) приготовили в виде раствора с концентрацией 100 мкг/мл (325 мкМ) в 10 % этаноле (EtOH), 10 % полисорбате 80 (PS80) и 80 % буфере PBS, pH 7,4.

Дифлунизал (ММ: 250,2 г/моль) приготовили в виде раствора с концентрацией 1,875 мг/мл в 12, 5% EtOH, 12,5% PS80 и 75 % буфере PBS.

AG10 (ММ: 292,3 г/моль) приготовили в виде раствора с концентрацией 200 мкг/мл в 10 % EtOH, 10 % PS80 и 80 % буфере PBS, pH 7,4, следующим образом: 2 мг AG10 солюбилизировали в 1 мл чистого этанола, добавили 1 мл полисорбата 80 и постепенно разбавили 8 мл буфера PBS при постоянном перемешивании.

Растворы стабилизаторов TTR:

Материал	Источник	Идентификационный номер
Тафамидис	Biosynth-Carbosynth	FD27988
Дифлунизал	Sigma	D3281
AG10	Aquila Pharmatech	AN16167
Этанол 100 %	Sigma	02870
Полисорбат 80	Sigma	P5188
Буфер PBS, pH 7,4, 1×	Gibco	10010-015

Животная модель ATTR

Мышей с амилоидным ксенотрансплантатом, полученным от пациента (PDAX), получали и применяли, как описано в WO 2020/094883 A1.

ИФА

- В лунках 96-луночных микропланшетов в течение 1 часа при 37 °С иммобилизовали агрегаты mis.WT-TTR, разведенные до концентрации 10 мкг/мл в буфере PBS, pH 7,4. Сайты неспецифического связывания блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ) блокирующим буфером, содержащим 2 % бычий сывороточный альбумин (БСА) и 0,1 % твин-20 в буфере PBS. Человеческое антитело NI-301.37F1 разводили в двух повторностях до указанных концентраций в буфере PBS с добавлением тафамидиса или дифлунизала в концентрации 10 мкг/мл или буфера-носителя в соответствующей концентрации и инкубировали в течение ночи при температуре 4 °С. Связывание определяли с применением антитела к IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP), с последующим измерением активности HRP с помощью стандартного колориметрического анализа.

Определение EC₅₀

- Данные анализировали с помощью программного обеспечения Prism от GraphPad. Значения EC₅₀ оценивали с применением нелинейного регрессионного анализа отдельных экспериментальных точек, используя модель зависимости ответа от логарифма концентрации агониста с переменным угловым коэффициентом. Подбор кривой по данным выполняли путем нахождения параметров регрессии методом наименьших квадратов.
- Реактивы и приборы для ИФА с целью определения EC₅₀:*

Описание	Источник	Идентификационный номер
Планшеты для ИФА с уменьшенной площадью дна (½ от стандартной)	Corning	3690
Фосфатно-солевой буфер, pH 7,4 (PBS)	Gibco	10010-015
Твин-20	Sigma	P1379-500ML
Бычий сывороточный альбумин (БСА)	Sigma	A8022
Антитело к человеческому IgG, меченное HRP	Jackson ImmunoResearch	709-036-098
TMB	Pierce	34021, партия UF284180
Стоп-раствор	Invitrogen	SS04, партия 206369000

VarioScan Lux	ThermoFischer Scientific	2016-03-00700
Prism	GraphPad	v.8

Кинетический анализ связывания

Антитело NI-301.37F1 загружали на биосенсоры с иммобилизованными антителами к домену Fc человеческого IgG в концентрации 5 мкг/мл в буфере PBS в течение 5 мин при 25 °С. Анализ связывания проводили с применением растворимых амилоидных агрегатов WT-TTR и тетрамерных WT-TTR. Оценку на исходном уровне выполняли в 1× кинетическом буфере в течение 3 мин, ассоциацию измеряли в течение 10 мин и диссоциацию — в течение еще 10 мин в 1× кинетическом буфере, все этапы выполняли при 25 °С со встряхиванием при 1000 об/мин. Также в анализ был включен образец для сравнения, состоящий из 1× кинетического буфера.

Данные анализировали в программном обеспечении ForteBio Data Analysis 8.2 с использованием вычитания значения, полученного для образца сравнения, и межшаговой коррекции между ассоциацией и диссоциацией.

Реактивы и приборы для кинетического анализа связывания:

Описание	Источник	Идентификационный номер
Биосенсоры с иммобилизованными антителами к домену Fc человеческого IgG (АНС)	Molecular Devices	18-5060
Octet Red96	Molecular Devices	OCTETRED96
Кинетический буфер 10×	Molecular Devices	18-1092

Пример 1. Сохранение связывания NI-301.37F1 с мишенью в присутствии стабилизаторов тетрамера TTR

Для оценки аффинности связывания антитела к TTR в присутствии стабилизатора тетрамера TTR проводили прямой ИФА и определение EC₅₀ по существу как описано в примере 3 в WO 2015/092077 A1. Проводили иммобилизацию амилоидных агрегатов wtTTR на планшетах для ИФА в течение 1 ч при 37 °С и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре блокирующим буфером (буфер PBS, pH 7,4, 1 % БСА и 0,1 % полисорбат 20).

Тафамидис и дифлунизал растворяли в носителе (80 % буфер PBS, pH 7,4, 10 % этанол, 10 % полисорбат 80) и готовили серии разведений антитела NI-301.37F1 с применением раствора тафамидиса или дифлунизала в конечной концентрации 10 мкг/мл или соответствующего объема носителя. Концентрация 10 мкг/мл на 40 % превышает

5 максимальную пиковую концентрацию у пациентов, получавших лечение тафамидисом в дозе 80 мг в сутки (около 6 мкг/мл). Серии разведений NI-301.37F1 инкубировали в планшетах для ИФА в течение ночи при температуре 4 °C, и после промывок проводили детекцию NI-301.37F1 с применением конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела к IgG человека и стандартных методов детекции. Данные анализировали с

10 помощью программного обеспечения Prism от GraphPad. Значения EC₅₀ оценивали с применением нелинейного регрессионного анализа отдельных экспериментальных точек, используя модель зависимости ответа от логарифма концентрации агониста с переменным угловым коэффициентом. Подбор кривой по данным выполняли путем нахождения параметров регрессии методом наименьших квадратов.

15

Результаты показали, что связывание антитела NI-301.37F1 с амилоидогенным TTR сохраняется в присутствии стабилизаторов TTR, таких как тафамидис и дифлунизал.

Модельных мышей с амилоидным ксенотрансплантатом, полученным от пациента

20 (PDAX), получали, как описано в WO 2020/094883 A1.

Пример 2. Комбинация лекарственных средств NI-301.37F1-стабилизатор TTR активна *in vivo*

Мышам с трансплантатом амилоидогенного TTR (мышинная модель PDAX) немедленно

25 проводили однократное введение химерного мышинового варианта NI-301.37F1 (ch.NI-301.37F1) в дозе 10 мг/кг в/в (внутривенная инъекция) или антитела соответствующего изотипа в качестве отрицательного контроля. Тафамидис и дифлунизал растворяли в носителе (80 % буфер PBS, pH 7,4, 10 % этанол, 10 % полисорбат 80). Тафамидис вводили в дозе 1 мг/кг ежедневно и/п (интраперитонеальная инъекция). Этот уровень

30 дозы соответствует 33 % крысиного эквивалента максимальной рекомендованной дозы для человека (МРДЧ). Дифлунизал, у которого гораздо более высокая скорость элиминации и более низкая аффинность связывания с TTR, вводили два раза в сутки в дозе 19 мг/кг и/п утром и вечером.

- Через 96 часов после трансплантации фибрилл и введения антител животных умерщвляли для сбора тканей кожи и пересаженных трансплантатов фибрилл амилоидогенного TTR. Из трансплантатов были получены срезы, и шесть не последовательных срезов применяли для количественного определения остаточного количества фибрилл амилоидогенного TTR в трансплантате с помощью иммуногистохимического (ИГХ) анализа. ИГХ анализ TTR проводили с применением для окрашивания коммерческого антитела к TTR Dako A0002. В частности, иммуноокрашивание проводили в соответствии со стандартными процедурами и как описано в WO 2020/094883 A1. Количественное определение амилоидогенного TTR в трансплантате проводили с помощью автоматизированного процесса анализа изображений. Данные анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа и теста Шидака для межгруппового сравнения, соотнося их с данными группы введения антитела того же изотипа и носителя.
- Результаты показали, что активность ch.NI-301.37F1 по элиминации фибрилл сохранялась *in vivo* при совместном лечении тафамидисом и дифлунизалом, с выраженным эффектом в присутствии тафамидиса, который, по-видимому, даже усиливал элиминацию *in vivo* патологических фибрилл TTR, индуцированную антителом, в то время как совместное лечение дифлунизалом приводило к несколько более низкой, но все же значимой скорости элиминации; см. фиг. 2 и пример 3.

Пример 3. Опосредованная антителом активность по элиминации фибрилл *in vivo* требует наличия активного домена Fc

- Мышам с трансплантатом амилоидогенного TTR (мышьяная модель PDAX) вводили антитело ch37F1 в дозе 0,15, 0,5, 1,5 и 5 мг/кг в/в, или вариант ch37F1-LALAPG с неактивным доменом Fc, или контрольное антитело с тем же изотипом в дозе 5 мг/кг. Комбинации аминокислотных замен L234A, L235A и P329G достаточно для практически полного прекращения связывания с FcγR1, 2, 3 и 4 и связывания фактора комплемента C1q при сохранении стабильности антитела (Lo *et al.*, J. Biol. Chem. 292 (2017), 3900-3908). Через 5 дней собирали трансплантаты фибрилл ATTR и количественно определяли остаточное количество фибрилл ATTR с применением ИГХ анализа, проводимого как в примере 2. Как показано на фиг. 3, через 5 дней после трансплантации фибрилл и введения препаратов для лечения: фибриллы ATTR покрывали 46 % площади трансплантата у мышей, получивших антитело того же изотипа, 23,6 % у мышей,

получивших ch.NI-301.37F1, и 46,5 % у мышей, получивших ch.NI-301.37F1-LALAPG. Активность по элиминации фибрилл, наблюдаемая при введении ch.NI-301.37F1, была статистически значимой по сравнению с таковой при введении антитела того же изотипа ($p < 0,001$, 1-факторный дисперсионный анализ и критерий Даннетта для множественных сравнений). Напротив, у мышей, получавших ch.NI-301.37F1-LALAPG, не наблюдалась активность по элиминации фибрилл по сравнению с мышами, получавшими антитело того же изотипа. Эти результаты указывают на то, что для опосредованной антителом элиминации фибрилл фагоцитарными иммунными клетками *in vivo* необходим активный домен Fc.

Пример 4. Кинетика связывания антитела к TTR в присутствии агента, стабилизирующего TTR

4.1 Изучение селективности связывания NI-301.37F1 в присутствии тафамидиса и дифлунизала с применением биослойной интерферометрии (BLI)

Отсутствие связывания NI-301.37F1 с тетрамерами TTR исследовали в присутствии и в отсутствие стабилизаторов TTR, применяя BLI. Растворимые олигомеры ATTR были включены в этот эксперимент в качестве положительных контролей.

Результаты показали, что NI-301.37F1 не связывался с тетрамерами TTR в растворе, что согласуется с предыдущими результатами. Кроме того, результаты показали, что NI-301.37F1 не связывался с комплексами TTR-тафамидис и TTR-дифлунизал (фиг. 4A, 4B).

4.2 Изучение кинетики и селективности связывания NI-301.37F1 в присутствии AG10 и дифлунизала с применением BLI

Связывание NI-301.37F1 с олигомерами ATTR и тетрамерами TTR оценивали в присутствии стабилизаторов TTR AG10 и дифлунизала в концентрации 5 мкг/мл или в присутствии соответствующего буфера-носителя с применением BLI.

Результаты показали, что связывание NI-301.37F1 с олигомерами ATTR в растворе было практически идентичным в присутствии или в отсутствие AG10 или дифлунизала (фиг. 5A, 5B).

Заключение

NI-301.37F1 со схожей аффинностью связывается с амилоидом ATTR в присутствии или в отсутствие стабилизаторов TTR тафамидиса, дифлунизала и AG10.

Аналогично, селективность связывания NI-301.37F1, характеризующаяся отсутствием связывания с тетрамерами TTR, сохраняется в присутствии стабилизаторов TTR.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинированное терапевтическое средство для применения в способе лечения транстиретинового амилоидоза (ATTR), включающая антитело к транстиретину (TTR) и стабилизатор тетрамера TTR, при этом указанное антитело имеет активный домен Fc и способно индуцировать элиминацию фибрилл ATTR посредством антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ).

2. Комбинированное терапевтическое средство для применения по п. 1, характеризующееся тем, что указанное антитело относится к классу или изотипу IgG1.

3. Комбинированное терапевтическое средство для применения по любому из пп. 1 или 2, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой антитело человеческого происхождения.

4. Комбинированное терапевтическое средство для применения по любому из пп. 1–3, характеризующееся тем, что указанное антитело способно связываться с эпитопом TTR, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности WEPFA (SEQ ID NO: 7), и при этом указанное антитело содержит в своей вариабельной области или связывающем домене:

(i) шесть CDR вариабельной области V_H и V_L , выбранных из:

VH-CDR1: положения 31–35 последовательности SEQ ID NO: 2;

VH-CDR2: положения 52–67 последовательности SEQ ID NO: 2;

VH-CDR3: положения 100–109 последовательности SEQ ID NO: 2;

VL-CDR1: положения 24–34 последовательности SEQ ID NO: 4;

VL-CDR2: положения 50–56 последовательности SEQ ID NO: 4;

VL-CDR3: положения 89–97 последовательности SEQ ID NO: 4,

или где одна или более CDR могут содержать одну или две аминокислотные замены;

VH-CDR1: положения 31–35 последовательности SEQ ID NO: 6;

VH-CDR2: положения 52–67 последовательности SEQ ID NO: 6;

VH-CDR3: положения 100–109 последовательности SEQ ID NO: 6;

VL-CDR1: положения 24–34 последовательности SEQ ID NO: 4;

VL-CDR2: положения 50–56 последовательности SEQ ID NO: 4;
 VL-CDR3: положения 89–97 последовательности SEQ ID NO: 4,
 или где одна или более CDR могут содержать одну или две
 аминокислотные замены; или

5

(ii) область V_H тяжелой цепи, содержащую аминокислотную
 последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную
 последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, и область V_L легкой
 цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей
 мере на 90 % идентичную последовательности SEQ ID NO: 4.

10

5. Комбинированное терапевтическое средство для применения по любому из пп. 1–
 4, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит в своей
 вариабельной области или связывающем домене аминокислотные
 последовательности областей V_H и V_L тяжелой и легкой цепей — SEQ ID NO: 2 и
 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 4.

15

6. Комбинированное терапевтическое средство для применения по любому из пп. 1–
 5, характеризующееся тем, что указанный стабилизатор представляет собой
 тафамидис, дифлунизал, AG10 или их комбинацию.

20

7. Комбинированное терапевтическое средство для применения по любому из пп. 1–
 5, характеризующееся тем, что указанный стабилизатор представляет собой
 тафамидис.

25

8. Комбинированное терапевтическое средство для применения по любому из пп. 1–
 7, характеризующееся тем, что указанное антитело к TTR предназначено для
 введения в дозе 1, 3, 10, 30 или 60 мг/кг или в дозе с промежуточным значением
 каждые 2–4 недели, и стабилизатор тетрамера TTR в клинически активной
 концентрации.

30

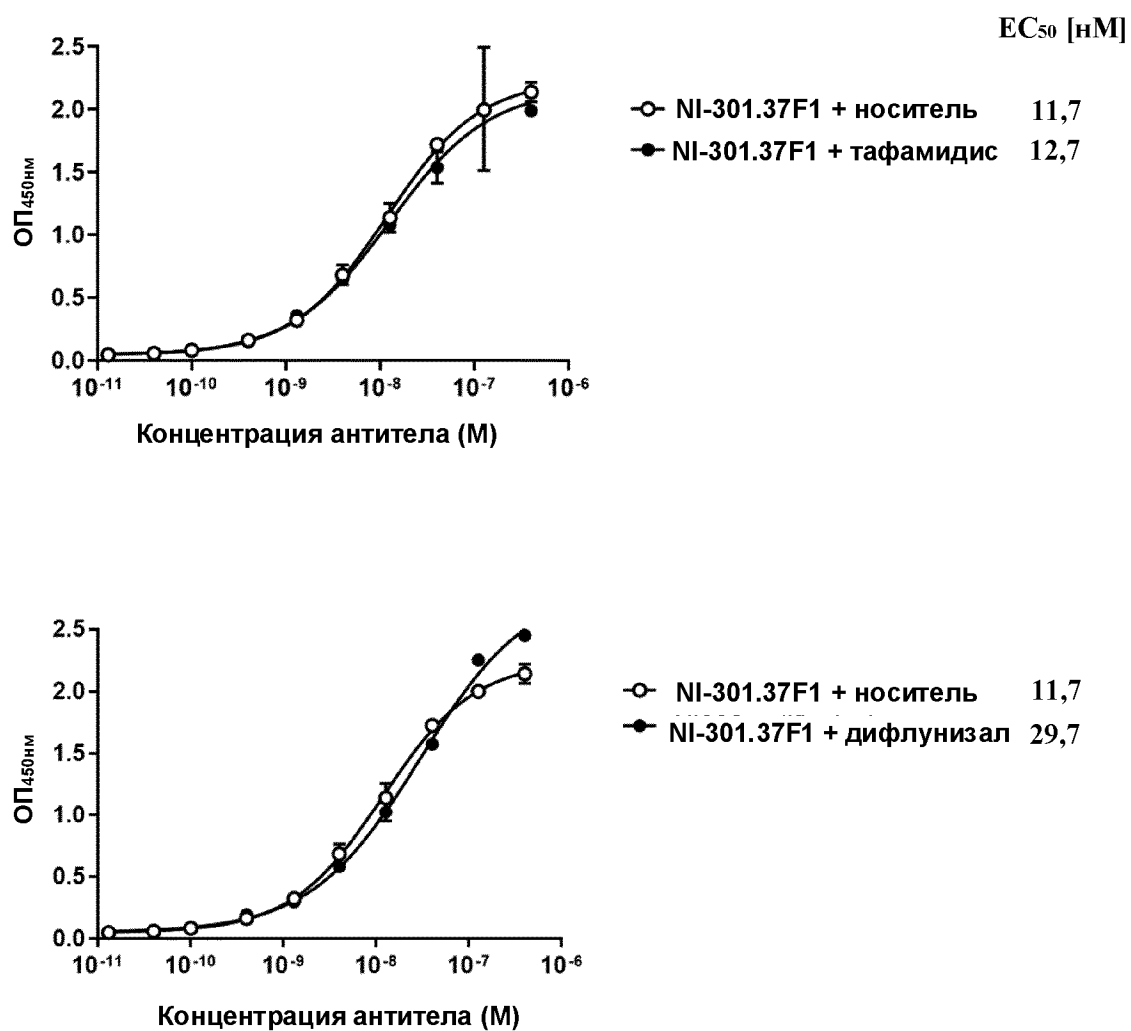
9. Комбинированное терапевтическое средство для применения по п. 8,
 характеризующееся тем, что стабилизатор представляет собой тафамидис или
 тафамидиса меглюмин и предназначен для введения в дозе 1, 5, 15 или

30 мг/кг/сут или в дозе с промежуточным значением, необязательно в дозе 20 или 80 мг/сут тафамидиса меглюмина и 12,2 или 61 мг/сут тафамидиса соответственно.

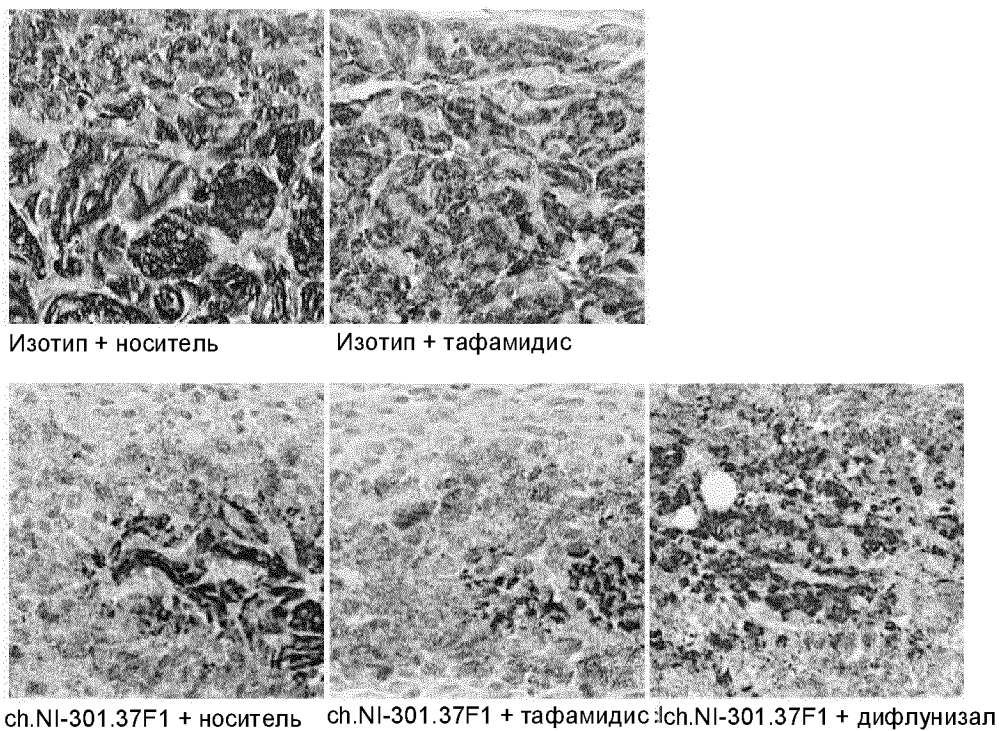
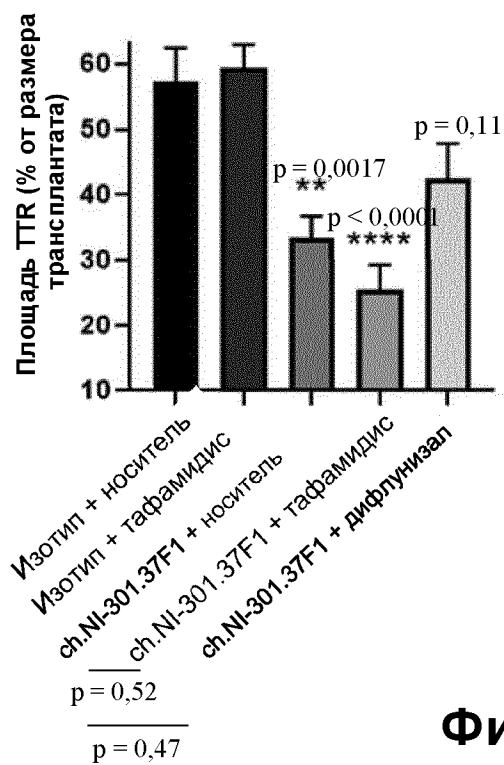
- 5 10. Комбинированное терапевтическое средство для применения по п. 8, характеризующееся тем, что указанный стабилизатор представляет собой AG10 и предназначен для введения в дозе 50, 150, 300, 400 или 800 мг или в дозе с промежуточным значением, необязательно два раза в сутки.
- 10 11. Комбинированное терапевтическое средство для применения по п. 8, характеризующееся тем, что указанный стабилизатор является дифлунизалом и предназначен для введения в дозе 250 мг, необязательно два раза в сутки.
12. Комбинированное терапевтическое средство для применения по любому из пп. 1–
15 11, характеризующееся тем, что указанное антитело к TTR вводят одновременно со стабилизатором, до или после него.
13. Комбинированное терапевтическое средство для применения по любому из пп. 1–
20 12, характеризующееся тем, что указанное антитело и указанный стабилизатор представлены в фармацевтическом продукте или в виде комплекта в отдельных контейнерах.
14. Комбинированное терапевтическое средство для применения по п. 13, характеризующееся тем, что указанное антитело представлено в виде жидкого
25 препарата в инфузионном флаконе или мешке и/или указанный стабилизатор представлен в таблетке или капсуле для перорального введения.
15. Фармацевтический продукт или комплект по п. 13 или 14.
- 30 16. Антитело к TTR, определенное в любом из предшествующих пунктов, для применения в лечении ATTR у субъекта, который получает лечение стабилизатором тетрамера TTR, определенным в любом из предшествующих пунктов, или стабилизатор тетрамера TTR, определенный в любом из предшествующих пунктов, для применения в лечении ATTR у субъекта, который

получает лечение антителом к TTR, определенным в любом из предшествующих пунктов.

- 5 17. Способ лечения ATTR путем индуцирования или стимулирования элиминации фибрилл ATTR посредством антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), включающий введение нуждающемуся в этом пациенту антитела к транстиретину (TTR) и стабилизатора тетрамера TTR.
- 10 18. Способ по п. 17, характеризующийся тем, что указанное антитело к TTR представляет собой антитело, определенное в любом из предшествующих пунктов, и/или указанный стабилизатор тетрамера TTR представляет собой стабилизатор, определенный в любом из предшествующих пунктов.
- 15 19. Способ по п. 17 или 18, характеризующийся тем, что указанное антитело и указанный стабилизатор вводят одновременно, один за другим или последовательно.
- 20 20. Комбинированное терапевтическое средство для применения по любому из пп. 1–14, или антитело к TTR, стабилизатор тетрамера TTR для применения по п. 16, или способ по любому из пп. 17–19, где ATTR представляет собой ATTR дикого типа (wtATTR) или вариантный ATTR (vATTR), и где ATTR ассоциирован с заболеванием или состоянием, выбранным из группы, состоящей из ATTR-полинейропатии, ATTR-кардиомиопатии, семейной амилоидной полинейропатии (САП), старческого системного амилоидоза (ССА), системного семейного амилоидоза, лептоменингеального амилоидоза/амилоидоза центральной нервной системы (ЦНС), связанного с TTR амилоидоза глаз, связанного с TTR амилоидоза почек, связанной с TTR гипертироксинемии, связанного с TTR амилоидоза связок, включая синдром запястного канала, разрывы ротаторной манжеты и стеноз позвоночного канала поясничного отдела, и презеклампсии.

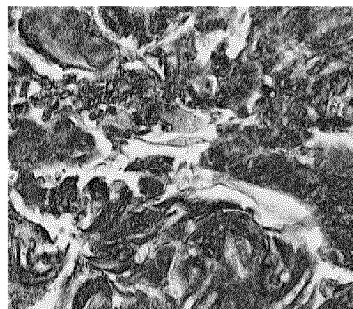


Фиг. 1

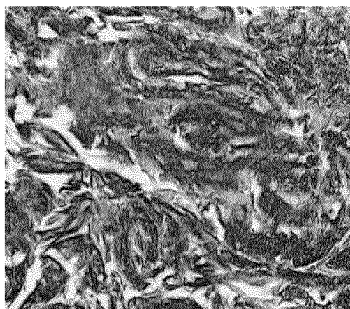
A**B**

Размер группы	ch.NI-301.37F1 10 мг/кг	Изотип 10 мг/кг
Носитель	8	6
Тафамидис 1 мг/кг ежедневно	8	7
Дифлунизал 19 мг/кг два раза в сутки	6	-

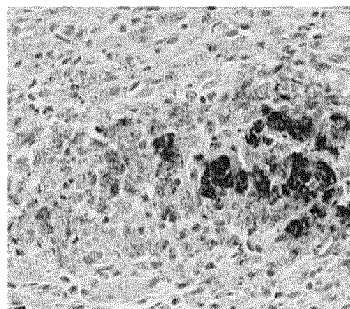
Фиг. 2

A

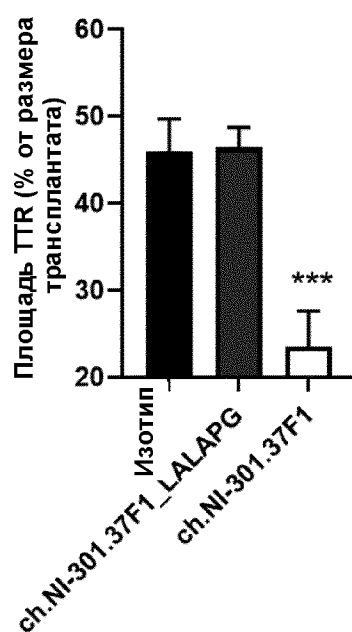
Изотип



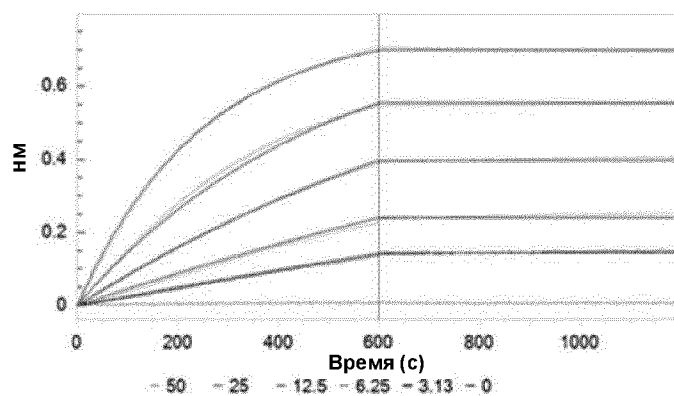
ch.NI-301.37F1_LALAPG



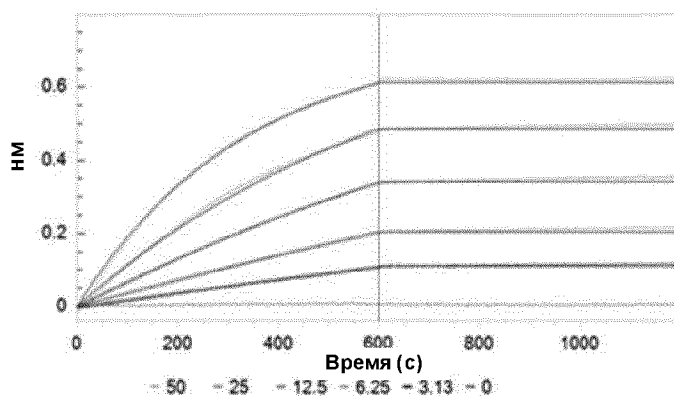
ch.NI-301.37F1

B**Фиг. 3**

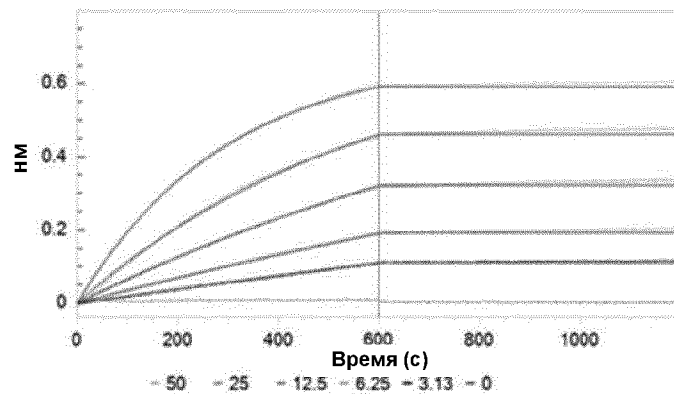
mis.WT-TTR — Носитель



mis.WT-TTR — Тафамидис



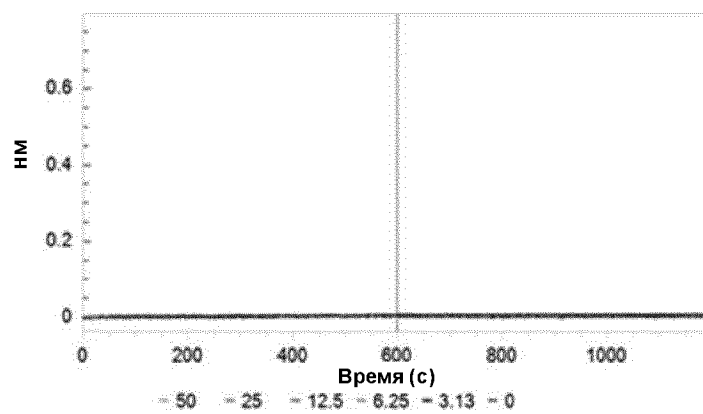
mis.WT-TTR — Дифлунизал



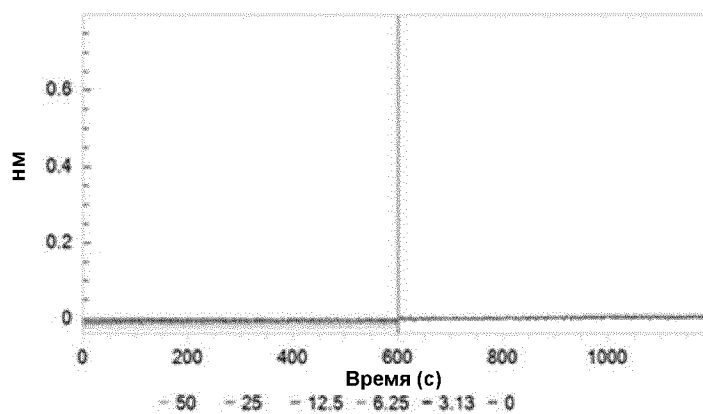
Фиг. 4А

5/7

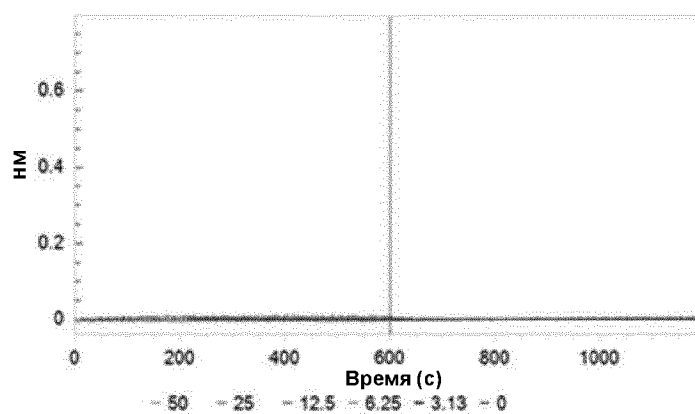
tetr.WT-TTR — Носитель



tetr.WT-TTR — Тафамидис

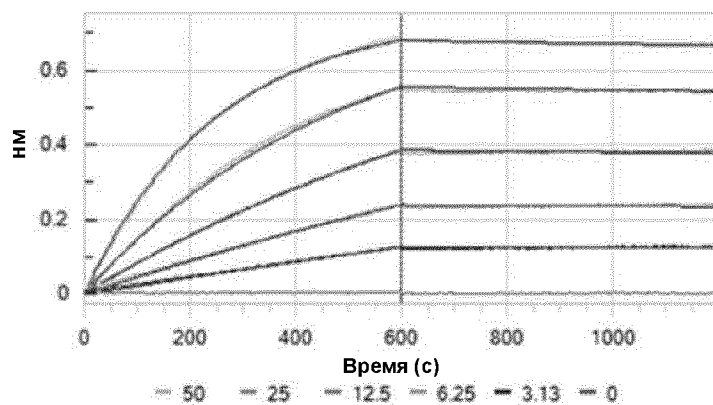


tetr.WT-TTR — Дифлунизал

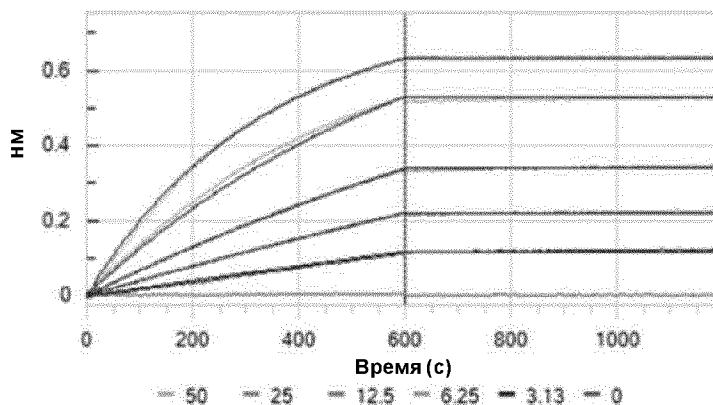


Фиг. 4В

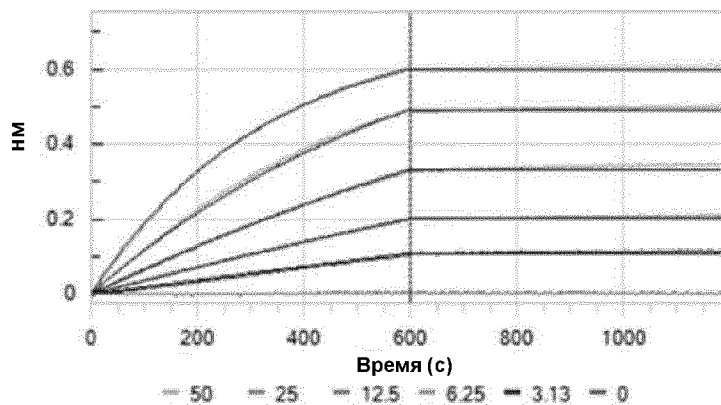
mis.WT-TTR — Носитель



mis.WT-TTR — AG10

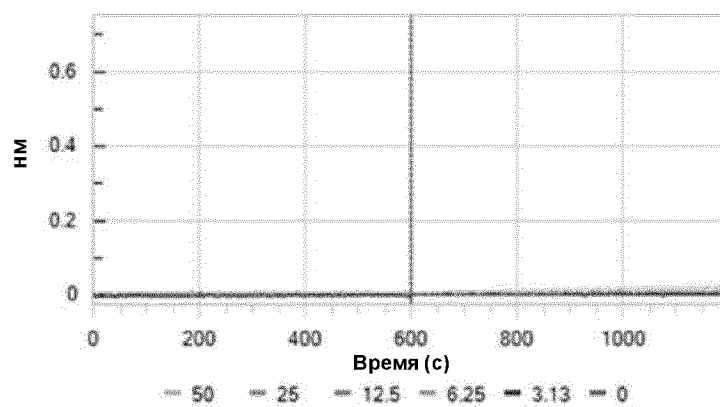


mis.WT-TTR — Дифлунизал

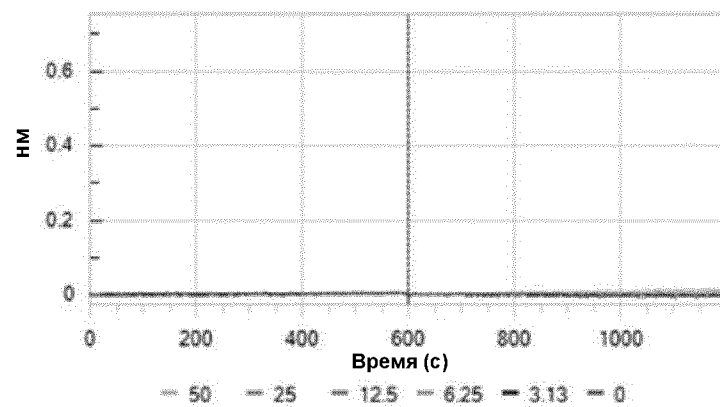


Фиг. 5А

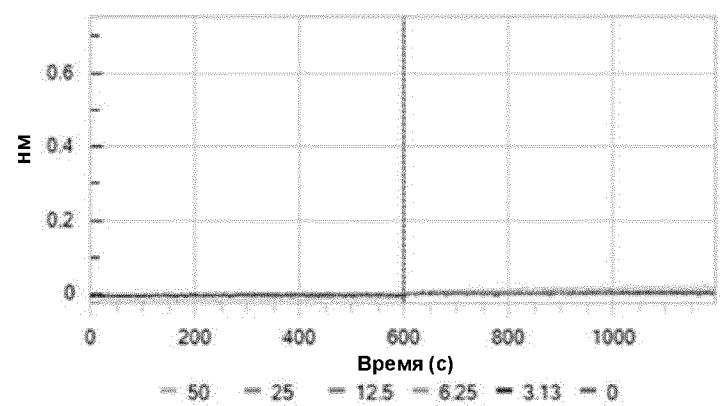
tetr.WT-TTR — Носитель



tetr.WT-TTR — AG10



tetr.WT-TTR — Дифлунизал



Фиг. 5В